

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

JANAINA EMILIANO

**Componentes do metabolismo secundário bacteriano com potencial inibitório
sobre *Sclerotinia sclerotiorum***

PONTA GROSSA
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

JANAINA EMILIANO

**Componentes do metabolismo secundário bacteriano com potencial inibitório
sobre *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi

Co-orientadora: Profa. Dra. Sônia Alvim Veiga Pileggi

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Emiliano, Janaina

E53 Componentes do metabolismo secundário
 bacteriano com potencial inibitório sobre
 Sclerotinia sclerotiorum/ Janaina
 Emiliano. Ponta Grossa, 2016.
 164f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Biológicas - Área de Concentração:
 Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
 de Ponta Grossa e Universidade Estadual do
 Centro-Oeste.

 Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.
 Coorientadora: Prof^a Dr^a Sônia Alvim
 Veiga Pileggi.

 1.Estresse oxidativo. 2.Enzimas
 antioxidativas. 3.Peroxidação lipídica.
 4.Sistemas de respostas adaptativas.
 5.Controle biológico. I.Pileggi, Marcos.
 II. Pileggi, Sônia Alvim Veiga. III.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Universidade Estadual do Centro-Oeste.

CDD: 576.8



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 03/2016

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Janaina Emiliano**.

Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Marcos Pileggi em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Janaina Emiliano**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcos Pileggi (Orientador UEPG), Dr. Galdino Andrade Filho (UEL) e Dr^a Edilaine Mauricia Gelinski Grabicoski (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Componentes do metabolismo secundário bacteriano com potencial inibitório sobre *Sclerotinia sclerotiorum***". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 90 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 25 de fevereiro de dois mil e dezesseis.

Prof. Dr. Marcos Pileggi (UEPG) _____

Prof^a Dr. Galdino Andrade Filho (UEL) _____

Prof. Dr^a Edilaine Mauricia Gelinski Grabicoski (UEPG) _____

Dedico este trabalho aos meus pais Osni e Evanisa Emiliano, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida acadêmica.

Agradecimentos

- À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro, e concessão da bolsa.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Pileggi, pelo apoio, incentivo, confiança e paciência durante toda minha trajetória acadêmica. Suas broncas e conselhos foram de grande importância para meu crescimento profissional e pessoal. Você sabe o quanto importante foi para mim nos momentos mais difíceis, segurando minha mão e dando o empurrão que precisava para não parar no meio do caminho, sempre abrindo meus olhos, fazendo-me enxergar que a vida é muito mais que nossos problemas, e que dias de sol sempre virão.
- À minha co-orientadora Profa. Dra. Sônia Alvim Veiga Pileggi, pelo aprendizado e incentivo em trabalhar com fungos, seus ensinamentos foram muito importantes para abrir meus olhos para uma linha de pesquisa a qual estou apaixonada. Seus conselhos foram de grande importância nos dias em que o mundo parecia que iria desabar.
- Aos meus pais, Osni e Evanisa Emiliano, pelo apoio e amor incondicional, em todas as etapas da minha vida, sem questionar minhas escolhas e apoiando cada uma delas, sem medir esforços para me ver feliz, fazendo o possível e o impossível para manter meus estudos em outra cidade. Não foi fácil, mas sem vocês, tudo isso seria impossível.
- À minha irmã, Jaqueline Emiliano, pelas conversas e desabaços nas horas em que mais precisei. Mesmo sem saber, você foi muito importante nesta jornada.
- Ao meu noivo, Eduardo Luiz Lima, que sempre esteve comigo, nas horas boas e ruins, nas angústias e nas alegrias, sempre me apoiando. Obrigada por me escutar nas horas de desabaço, e pela paciência nos momentos em que precisei me ausentar. Sua dedicação foi muito importante nesta conquista.
- Ao Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, pela confiança ao por abrir as portas de seu laboratório, para a realização de parte deste trabalho. Seu apoio foi fundamental para a realização desta dissertação.
- Ao Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, por sua orientação em uma área totalmente nova para mim, sua paciência foi muito importante para concluirmos este trabalho.
- À Profa. Dra. Luciana Boer, pelo auxílio nos primeiros passos do projeto, direcionando como poderíamos solucionar os problemas químicos.

- À Profa. Dra Rosilene Prestes, pela paciência e disponibilidade em realizar experimentos sobre lipídios de membrana, por mais que estes não tenham dado certo.
- Ao Prof. Dr. Péricles Martin Reche, por realizar as análises estatísticas deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho e à Dra Edilaine Mauricia Gelinski Grabicoski, por ceder a linhagem fungica utilizada neste trabalho.
- Às minhas queridas amigas Stella Marys Salazar e Elizângela Paz de Oliveira pela parceria, companheirismo, carinho e lealdade. Os dias no lab foram mais alegres ao lado de vocês. Espero nunca perdermos o contato, saibam que sempre terão um lugarzinho em meu coração.
- Ao Bruno C. do Espirito Santo, Valéria Cristina França e Ulisses Brigatto Albino pela amizade que aos poucos foi crescendo e surpreendendo a nós mesmos, o quanto nos damos bem, e o quanto vocês fazem falta quando estão longe.
- Aos colegas de laboratório Alyne, Jheni, Paloma, Cassiano, Géssica, Stephane, Alisson, Edna e Evelyn, pelas risadas, confidencias, ajuda nos experimentos, caçadas aos pokémons (por mais que tenha durado pouco, foi muito divertido, hahahah), e apesar de os mutirões terem sido exaustivos, demos muitas risadas e temos muitas histórias pra contar (as bolachas amanhadas vão ficar pra sempre na memória, hahah). E desculpa pelas broncas ou por pegar no pé de vocês, saibam que foi apenas para contribuir para o crescimento de cada um de vocês.
- À técnica do laboratório de microbiologia Maria Janina Pinheiro Diniz, pela paciência nos meus primeiros passos no lab, pela amizade construída nesses 7 anos de UEPG e pelo companheirismo.
- À Ane Stefano Simionato, pelo carinho e paciência nos momentos de maior dificuldade nos experimentos, sua ajuda foi muito importante para o andamento do trabalho. Sua amizade será para a vida toda.
- À Carolina Polano Vivan, pela amizade, conversas, companheirismo. Seu carinho foi muito importante durante a minha estadia em Londrina.
- Ao Miguel O. P. Navarro e ao André Barazetti, pelo carinho e paciência nos primeiros dias de lab. Sempre lembrarei das aulas de espanhol e sobre micorrizas.
- À Emanuele Luciano, por todas as conversas, conselhos, risadas. Você tem um coração enorme, e me mostrou uma amizade linda e sincera, espero um dia poder contribuir na sua carreira científica.

- Aos demais colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana da UEL, Carol Santos, Glenda, Igor, Allan, Vanessa, Bárbara, João, Renata, Vivi, e Alejandra pela hospitalidade e carinho, vocês foram muito importantes na minha estadia em Londrina.

- Aos professores e colegas do laboratório de genética, pela hospitalidade e por ceder o uso de alguns equipamentos.

- A todos os professores e funcionários do PPG Biologia Evolutiva.

- A todos, que direta ou indiretamente, me ajudaram nesta conquista.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Resumo

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é o causador da doença conhecida como mofo branco em uma ampla gama de hospedeiros, sendo o responsável por perdas significativas na agricultura. Uma vez que o uso de fungicidas tem causado problemas ambientais, o controle biológico tem sido considerado uma abordagem promissora. *Pseudomonas aeruginosa* (linhagem LV) produz metabólitos capazes de inibir o crescimento de vários microrganismos, entre os quais o fitopatógeno *Xanthomonas* spp., patógenos humanos como *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, além de interferentes de processos industriais, como *Lactobacillus* sp. Linhagens com potencial antagonico, ao entrarem em contato com patógenos, podem aumentar seus níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando à morte celular. Para minimizar estes efeitos danosos, organismos desenvolveram mecanismos de combate, denominado de sistema antioxidativo de defesa. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (linhagem LV) em superar o sistema de respostas antioxidativas em *S. sclerotiorum*. A linhagem bacteriana foi isolada em lesão por cancro cítrico, região submetida a altos níveis de estresse por competição. Diferentes testes de antagonismo foram realizados por meio de difusão em ágar. Após encontrada a fração com potencial inibitório sobre o fungo, este foi submetido a testes de estresse oxidativo, como a quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de malondialdeído (MDA); e de avaliação de sistemas de respostas antioxidativas, como a atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), e catalase (CAT). Nossos dados mostraram que *P. aeruginosa* produz metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento micelial e a germinação de escleródios em *S. sclerotiorum*. Os efeitos antifúngicos dos metabólitos foram mais potentes com maiores graus de pureza. A fração F4, separada da fração bruta dos metabólitos bacterianos, aumentou os níveis de estresse oxidativo no fungo. O sistema antioxidativo de *S. sclerotiorum* possui as isoenzimas Mn-SOD e Fe-SOD, e de única isoforma de CAT. As atividades gerais de SOD aumentaram nos tratamentos com a fração F4 em relação aos controles, mas sem um aumento correspondente na atividade de CAT. Assim os maiores níveis de H_2O_2 gerados em *S. sclerotiorum* não puderam ser controlados com eficiência, afetando a capacidade de crescimento e de germinação de escleródios. Por esta razão, *P. aeruginosa* apresenta um uso potencial no controle biológico de *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: estresse oxidativo, enzimas antioxidativas, peroxidação lipídica, sistemas de respostas adaptativas, controle biológico, escleródios.

Abstract

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary is phytopathogen that causes the white mold disease in a wide range of hosts, and is responsible for significant losses in agriculture. Biological control has been considered a promising approach since the use of fungicides has caused environmental problems. *Pseudomonas aeruginosa* (LV strain) produces metabolites capable of inhibit growing of several microorganisms, as important phytopathogens like *Xanthomonas* spp., human pathogens as *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*, as well as industrial process interferents as *Lactobacillus* sp. Strains with antagonistic potential may increase levels of reactive oxygen species (ROS) in contact with pathogens, leading to cell death. To avoid damage, antioxidant defense systems were developed. The objective of this study was to evaluate the potential of secondary metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* (LV strain) in overcoming the antioxidative system in *S. sclerotiorum*. The bacterial strain was isolated from a citrus canker lesion, a region probably with high levels of competition stress. Different antagonism tests were performed by agar diffusion methods. The chemical fraction showing fungal inhibitory potential was used to develop oxidative stress experiments, as hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) quantification, and evaluation of antioxidant responses, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities. Our results showed that *P. aeruginosa* produces secondary metabolites that can inhibit mycelia growth and sclerotia germination, mainly in higher degrees of purity of the metabolites. The F4 purified fraction increased the levels of oxidative stress in the fungus. The antioxidant system of *S. sclerotiorum* is constituted by Mn-SOD and Fe-SOD isozymes, and a single CAT isoform. In general, SOD activities were higher in F4 fraction treatments than in control, but with no correspondent increase in CAT activity. As a consequence, there was an increase in H₂O₂ level, affecting mycelia growth and sclerotia germination. For this reason, we consider that *P. aeruginosa* presents potential use in biological control of *S. sclerotiorum*.

Keywords: oxidative stress, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, adaptive response systems, biological control, sclerotia.

Lista de figuras

- Figura 1** – Antagonismo direto entre *S. sclerotiorum* e *P. aeruginosa*. **A**: avaliação diária do crescimento fungico no controle e confronto. **B**: placas com inóculo de ambos controles e de configuração de antagonismo com 7 dias de incubação. 44
- Figura 2** – Teste de poço utilizando o sobrenadante concentrado de *P. aeruginosa* sobre o crescimento de *S. sclerotiorum*. **A**: avaliação diária do crescimento fungico no controle e tratamento. **B**: inibição fúngica em diferentes tempos de incubação, onde **C** é o poço controle contendo CN + CuCl₃ e **S** é o poço contendo sobrenadante bacteriano concentrado. 45
- Figura 3** – Teste de dico utilizando a fração bruta dos metabólitos isolados de *P. aeruginosa* sobre *S. sclerotiorum*. **A**: avaliação diária do crescimento fúngico na presença de discos em diferentes concentrações de fração bruta. **B**: inibição de *S. sclerotiorum* onde **C** é o disco controle contendo diclorometano e **FD** o disco contendo a fração bruta em diferentes concentrações, no sétimo dia de avaliação. 47
- Figura 4** - Teste de dico utilizando a fração F4 em contraposição ao crescimento de *S. sclerotiorum*. **A**: avaliação diária do crescimento fúngico na presença de discos em diferentes concentrações da fração F4. **B**: inibição de *S. sclerotiorum* onde **C** é o disco controle contendo diclorometano e **F4** é o disco contendo a fração F4 em diferentes concentrações, no sétimo dia de avaliação. 48
- Figura 5** – MIC da fração F4 em relação ao crescimento de hifas de *S. sclerotiorum*. **A**: avaliação diária do crescimento fúngico na presença da fração F4 em diferentes concentrações. **B**: inibição de *S. sclerotiorum* pela fração F4 no terceiro dia de avaliação. 49
- Figura 6** – MIC da fração F4 em relação à germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*. **A**: avaliação diária do crescimento fúngico na presença da fração F4 em diferentes concentrações. **B**: inibição de *S. sclerotiorum* pela fração F4 no terceiro dia de avaliação. 50
- Figura 7** – Viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* após teste de MIC em relação à germinação carpogênica. **Controle S. sclerotiorum**: avaliação da germinação de escleródios que não passaram pelo teste de MIC; **Escleródio transferido**: avaliação da germinação de escleródio que não apresentou crescimento no teste de MIC com 50 µg/mL da fração F4. 51
- Figura 8** – Determinação dos níveis médios de H₂O₂ em *S. sclerotiorum* na presença da fração F4 nos tratamentos **BDC**: controle utilizando apenas meio BDC; **DMSO**: controle utilizando 0,5% de DMSO homogeneizado em BDC; **0,098**; **0,20**; **0,39** e **0,78**: concentrações em µg/mL da fração F4 diluídas em 0,5% de DMSO e homogeneizadas em BDC. As linhas verticais representam a barra de erro padrão. 52

Figura 9 - Quantificação de MDA em *S. sclerotiorum* na presença da fração F4. **BDC**: controle utilizando apenas meio BDC; **DMSO**: controle utilizando 0,5% de DMSO homogeneizado em BDC; **0,098; 0,20; 0,39 e 0,78**: concentrações em µg/mL da fração F4 diluídas em 0,5% de DMSO e homogeneizadas em BDC. As linhas verticais representam a barra de erro padrão. 53

Figura 10 – PAGE não-desnaturante para determinação de isoformas de SOD em *S. sclerotiorum*. **Controle**: gel revelado para SOD sem tratamento com H₂O₂ e KCN; **H₂O₂**: gel revelado para SOD com tratamento com H₂O₂; **KCN**: gel revelado para SOD com tratamento com KCN. 54

Figura 11 – Gel de SOD de *S. sclerotiorum*, quando esta foi incubada na presença da fração F4. **Controles**: BDC e DMSO; **Fração F4 (µg/mL)**: 0,098; 0,20; 0,39 e 0,78 em µg/mL da fração F4 54

Figura 12 – Gel de CAT de *S. sclerotiorum* após incubação com fração F4. **Controles**: BDC e DMSO; **Fração F4 (µg/mL)**: 0,098; 0,20; 0,39 e 0,78 em µg/mL da fração F4. 55

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	Fitopatógenos	16
1.2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	17
1.3	Controle biológico	19
1.5	Antagonismo por <i>Pseudomonas</i> sp.	21
1.6	Estresse oxidativo e sistema antioxidativo de defesa	22
1.7	Sistema antioxidativo de defesa	24
2.	OBJETIVOS	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Linhagens e condições de crescimento	27
3.2	Obtenção de metabólitos secundários	27
3.2.1	Antagonismo direto	27
3.2.2	Partição líquido-líquido	28
3.2.3	Cromatografia Líquida a Vácuo – CLV	28
3.3	Seleção de metabólitos secundários por difusão em ágar	28
3.3.1	Teste de poço	28
3.3.2	Teste em discos de difusão	29
3.4	Concentração Inibitória Mínima (MIC)	29
3.4.1	Concentração Inibitória Mínima (MIC) em Agar	29
3.4.2	Viabilidade de escleródios após MIC em Ágar	30
3.4.3	Concentração Inibitória Mínima (MIC) em caldo	30
3.5	Estresse oxidativo	30
3.5.1	Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio	30
3.5.2	Peroxidação lipídica.....	31
3.6	Sistema antioxidativo	31
3.6.1	Extração de proteínas	31
3.6.2	Quantificação de proteínas	31
3.6.3	Atividade das enzimas antioxidativas	32
3.6.4	Atividade de SOD em PAGE não desnaturante	32
3.6.5	Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não desnaturante	32
3.6.6	Atividade de CAT em PAGE não desnaturante	33

3.7	Análise estatística	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
	COMPONENTES DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE <i>Pseudomonasaeruginosa</i> COM POTENCIAL INIBITÓRIO SOBRE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....	34
4.1	INTRODUÇÃO	36
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.2.1	Linhagens e condições de crescimento	37
4.2.2	Produtos químicos e meios de cultura	38
4.2.3	Eficiência de inibição	38
4.2.4	Antagonismo direto	38
4.2.5	Produção e purificação de metabólitos com atividade antifúngica	38
4.2.5.1	Condições iniciais para extração dos metabólitos	38
4.2.5.2	Purificação por Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV).....	39
4.2.6	Análises biológicas	39
4.2.6.1	Avaliação da atividade antifúngica por teste de poço	39
4.2.6.2	Seleção de compostos com atividade antifúngica por teste de disco difusão	40
4.2.6.3	Concentração Inibitória Mínima (MIC) em ágar	40
4.2.6.4	Viabilidade de escleródios após MIC em ágar	41
4.2.6.5	Concentração Inibitória Mínima (MIC) em caldo.....	41
4.2.7	Avaliação de estresse oxidativo	41
4.2.7.1	Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio	41
4.2.7.2	Quantificação da peroxidação lipídica	42
4.2.8	Avaliação do sistema antioxidativo de resposta	42
4.2.8.1	Extração de proteínas	42
4.2.8.2	Determinação da atividade de SOD por eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE)	43
4.2.8.3	Determinação da atividade de CAT	43
4.2.9	Análise estatística	43
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.3.1	Avaliação do efeito antifúngico in vitro	43
4.3.1.1	Inibição por antagonismo direto	44
4.3.1.2	Inibição por metabólitos secundários em teste de poço	45

4.3.1.3	Avaliação da atividade antifúngica de FD e frações F por técnicas de ágar difusão in vitro	46
4.3.1.4	MIC da fração F4 sobre o crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> e viabilidade de escleródios	49
4.3.2	Avaliação do estresse oxidativo gerado pela fração F4	51
4.3.2.1	Quantificação de H ₂ O ₂ produzido por <i>S. sclerotiorum</i>	51
4.3.2.2	Produção de MDA pela reação com H ₂ O ₂	52
4.3.3	Avaliação do sistema antioxidativo de resposta de <i>S. sclerotiorum</i>	53
4.3.3.1	Atividade e isoformas de SOD na presença da fração F4	53
4.3.3.2	Atividade de CAT	55
4.4	CONCLUSÕES	56
4.5	REFERÊNCIAS	56
5.	REFERÊNCIAS GERAIS	63
	ANEXO A – Análises Estatísticas	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fitopatógenos

Até o final do século, a população mundial poderá chegar ao dobro do que é hoje. A crescente demanda por alimentos exigirá, cada vez mais, maior produtividade das culturas agrícolas e aumento das áreas de plantio. No entanto, mesmo com os avanços tecnológicos verificados a partir da década de quarenta, os microrganismos patogênicos, insetos pragas e plantas daninhas continuam a ser sérios problemas, e reduzir as perdas por eles causadas continua sendo o grande desafio da agricultura (NARWAL, 1996).

Evidências de interações planta-fungo podem ser traçadas até o Período Devoniano, a cerca de 450 milhões de anos, antes do aparecimento dos vertebrados terrestres. Ao longo do tempo, este longo período de co-evolução tem fomentado uma combinação diversificada de interações patogênicas (KABBAGE et al., 2015). Tradicionalmente, os estilos de vida de fungos patogênicos foram divididos em distintos grupos baseados na aquisição de nutrientes e na viabilidade da doença no hospedeiro.

Fungos biotróficos são parasitas que extraem seus nutrientes única e exclusivamente de células vivas, apresentando um alto grau de especificidade. Possuem vias de estruturas de alimentação especializadas, e geralmente precisam de produção de toxinas e secreção de enzimas que degradam a parede celular (KABBAGE et al., 2015). Esse grupo não apresenta fase saprofítica, de modo que a senescência do hospedeiro significa o fim do parasitismo. O principal mecanismo de sobrevivência dos fungos deste grupo são as plantas voluntárias, que com o advento do sistema plantio direto ocorrem com maior frequência. Servem de exemplos deste grupo os agentes causais das ferrugens, oídios, carvões e míldios (REIS e CASA, 1998).

Por outro lado, os fungos necrotróficos, ao contrário dos biotróficos, têm a habilidade de extrair nutrientes de tecidos mortos do hospedeiro. Pode-se dizer que vivem como saprófitas em plantas vivas. Inicialmente, por ação de toxinas ou enzimas, matam pequenas partes do limbo foliar e passam a extrair saprofiticamente os nutrientes de que necessitam para o seu desenvolvimento (REIS e CASA, 1998).

Por último, hemi-biotróficos exibem características de ambos, inicialmente invadindo células vivas antes de uma transição para um estilo de vida necrotrófico,

no qual os nutrientes são obtidos a partir de células hospedeiras que eles matam (KABBAGE et al., 2015).

Os fungos são o maior e mais diverso grupo de organismos fitopatogênicos. Todas as plantas são atacadas por patógenos fúngicos e alguns deles podem causar doenças em diversas plantas. Associado a isso, o modelo predominante da agricultura convencional, que tem como base o retorno econômico imediato, preconiza o controle dos problemas fitossanitários quase exclusivamente pela aplicação continuada e em larga escala de agrotóxicos. Assim, tem surgido diversos problemas de ordem ambiental, como contaminação de alimentos, solo, água e animais, intoxicação de agricultores, resistência de patógenos, surgimento de doenças iatrogênicas (as que ocorrem devido ao uso de agrotóxicos), desequilíbrio biológico com alterações da ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica, eliminação de organismos benéficos e redução da biodiversidade (MORANDI et al., 2009).

1.2 *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um fungo filamentoso cosmopolita e necrotrófico, causador da doença conhecida como mofo branco ou podridão branca, que é veiculada pelo solo. Possui pouca especificidade, com uma ampla gama de hospedeiros com mais 400 espécies de plantas, responsável por sérias perdas anuais de muitas culturas economicamente importantes, incluindo a soja, o feijão, a batata e a canola (KABBAGE et al., 2015; BOLTON et al., 2006; BOLAND e HALL, 1994).

S. sclerotiorum foi relatado pela primeira vez no Brasil no ano de 1921 no estado de São Paulo, ocorrendo com maior frequência na região sul do país, por apresentar temperaturas mais frias. O monocultivo de plantas altamente suscetíveis, a sucessão de culturas hospedeiras e o plantio de sementes infectadas, foram os principais fatores que levaram a um aumento da incidência deste fitopatógeno no Brasil (VRISMAN et al., 2014).

As características da doença são o desenvolvimento de micélio branco, em caule e frutos, e a formação de escleródios (agregados de hifas com camada exterior contendo melanina, é uma forma de resistência do fungo) em tecidos infectados da planta hospedeira ou no solo. O fungo pode passar até 90% de seu ciclo de vida na forma de escleródio, (ONARAN e YANAR, 2011) sobrevivendo por até 8 anos, ou até o momento em que encontra condições adequadas (alta umidade,

temperatura amena, 18 a 22°C, e luminosidade moderada) para a germinação. Esta pode ser miceliogênica, na qual serão produzidas hifas, infectando diretamente os tecidos da planta, ou carpogênica, com a produção de apotécios, os quais liberam ascósporos infecciosos. O maciço potencial reprodutivo, juntamente com capacidade de sobrevivência a longo prazo, faz dos escleródios componentes centrais na epidemiologia da doença (BOLTON et al., 2006).

Um fator chave que governa o sucesso deste fungo patogênico é a síntese e secreção de ácido oxálico, o qual contribui para a acidificação dos tecidos e sequestro de cálcio das paredes das células hospedeiras, o que facilita a ação de enzimas que degradam a parede celular (KABBAGE et al., 2015). Da mesma forma, favorece o desenvolvimento de escleródios, devido a diminuição do pH ambiental (BOLTON et al., 2006). O ácido oxálico também está envolvido na indução de uma resposta de defesa da planta hospedeira, que muitas vezes culmina em morte celular programada (MCP), necessária para o desenvolvimento da doença. Fungos mutantes deficientes em oxalato são reconhecidos pela planta hospedeira, a qual pode montar uma resposta oxidativa acentuada e deposição de calose (KABBAGE et al., 2015). A regulação da homeostase redox desempenha um papel chave neste processo; oxalato inicialmente atenua a resposta antioxidativa do hospedeiro (como parte de um potencial de interação biotrófica) antes de acionar espécies reativas de oxigênio (ERO) nos estágios posteriores da infecção, culminando em MCP e doença (KABBAGE et al., 2015).

Rotação de culturas agrícolas e pulverização de fungicidas são os principais métodos para controlar o mofo branco (LI et al., 2006). A rotação de culturas não resolve o problema, devido à persistência dos escleródios no solo (FERNANDO et al., 2007). Já o uso intensivo de fungicidas tem causado sérios problemas ambientais e aumentado a frequência e distribuição de isolados fúngicos resistentes (LI et al., 2006).

Desde as primeiras observações de doenças antagônicas que suprimem os microorganismos do solo, a mais de 70 anos, os patologistas de plantas ficaram estimulados pela idéia de que tais microorganismos poderiam ser usados como agentes de biocontrole, tanto no campo como em estufas. Desde então o controle biológico tem sido considerado uma abordagem promissora (HAAS e DÉFAGO, 2005).

1.3 Controle biológico

A comercialização de fungicidas tem apresentado crescimento expressivo no Brasil no últimos anos, o que mostra a importância do controle de fitopatógenos e a necessidade de desenvolvimento e introdução de alternativas de manejo. A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com resíduos de agrotóxicos têm alterado o cenário agrícola, resultando no surgimento de segmentos de mercado para produtos diferenciados, tanto os produzidos sem o uso de agrotóxicos, como os portadores de selos que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente. Além disso, o incremento dos custos com o controle químico, a perda de eficiência de alguns agrotóxicos, por causa da resistência dos organismos-alvo e os problemas ambientais advindos dessas práticas indicam a necessidade da busca de produtos biocompatíveis para o controle de fitopatógenos. (MORANDI et al., 2009).

Uma alternativa ao controle químico é o controle biológico, que além de apresentar especificidade ao alvo, utiliza diferentes meios para atingí-lo, restringindo as chances de selecionar linhagens resistentes. Em adição não contamina os alimentos e nem o meio ambiente, participando naturalmente da ciclagem dos nutrientes. Dentro deste contexto, o uso de microrganismos que antagonizam patógenos de plantas é uma saída sustentável para a problemática do controle de doenças na agricultura, a qual se perpetua por anos de cultivo agrícola, apesar do uso intenso de agrotóxicos (BETTIOL e MORANDI, 2009).

O termo antagonista é empregado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos patógenos, estando esses agentes adaptados ecologicamente ao mesmo nicho que os ocupados pelos patógenos (MORANDI et al., 2009). O uso de micro-organismos para o manejo de pragas na agricultura é uma das mais eficientes estratégias de controle biológico (VINALE et al., 2014), além de ser uma alternativa para aumentar a sustentabilidade da agricultura e diminuir o impacto em organismos não-alvo (VASCONCELLOS et al., 2014). Os micro-organismos podem competir por recursos, ou ainda produzir enzimas extracelulares ou metabólitos que podem afetar patógenos de plantas (ONARAN e YANAR, 2011).

Os efeitos benéficos são dependentes da linhagem, e as vantagens para a planta associada incluem a promoção do crescimento da planta e a melhoria da resistência do hospedeiro para ambos os estresses bióticos e abióticos, e a

supressão do patógeno. Este último pode ocorrer por meio de uma variedade de mecanismos, como antibiose, parasitismo, competição por nutrientes, entre outros (VINALE et al., 2014). Vários micro-organismos já são comercializados para serem utilizados como controle biológico de *S. sclerotiorum*, como os fungos *Trichoderma harzianum*, *Coniothyrium minitans*, e as bactérias *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* e *Bacillus subtilis* (ONARAN e YANAR, 2011).

1.4 Antimicrobianos

O controle biológico está em crescimento no Brasil, mas em progressão lenta, por falta de produtos biológicos disponíveis no mercado e pelo perfil conservador do agricultor brasileiro. A maior parte da comercialização de produtos microbianos é voltada para a agricultura convencional, principalmente para cultivos perenes e semiperenes e cultivos protegidos (MORANDI et al., 2009).

Os antimicrobianos naturais são compostos com capacidade para inibir o crescimento de microorganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos. Entende-se por antimicrobianos naturais, os compostos bioativos capazes de matar ou inibir o crescimento de micro-organismos, mas que são obtidos de origem natural através da atividade metabólica de plantas, fungos, bactérias, algas e animais. Entretanto, na indústria farmacêutica predominam os fármacos desenvolvidos a partir de biomoléculas produzidos por micro-organismos procariotos, principalmente porque esses seres possuem a capacidade de sintetizar milhares destes compostos durante o seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al, 2015).

Muitas bactérias utilizam-se do seu metabolismo secundário para produzirem compostos bioativos como forma de reduzir a competição por nutrientes no ambiente natural. A natureza complexa dessas biomoléculas muitas vezes impossibilita o crescimento de espécies competidoras, condicionando uma vantagem adaptativa aos micro-organismos que as produzem. Esses metabólitos secundários como são chamados, não são essenciais para o desenvolvimento do micro-organismo produtor, e sua síntese *in vitro* depende em grande parte das condições de cultivo em laboratório (MADIGAN et al, 2010).

Metabólitos com efeito fungicida são reponsáveis pela inibição do crescimento do micélio, além de promover a desorganização de células e da lise de hifas de alguns fungos (AHMED et al., 2003). Neste contexto de antibiose, metabólitos

secundários são moléculas de peso molecular relativamente baixo, biossintetizados em vias especializadas a partir de metabólitos primários, exibem uma vasta gama de atividades biológicas e desempenham um papel importante na regulação de interações entre organismos, como os antibióticos (VINALE et al., 2014).

As características das biomoléculas produzidas por bactérias tais como extensas atividades biológica e farmacêutica, grande diversidade entre outras, fazem com que este tipo de produto seja considerado de elevado potencial terapêutico, e conseqüentemente, de mercado. Dentre os principais organismos produtores de antimicrobianos com atividade antifúngica, destacam-se os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* (XIE et al., 2003).

1.5 Antagonismo por *Pseudomonas* sp.

Os gêneros bacterianos mais importantes utilizados como agentes de controle biológico são *Bacillus* e *Pseudomonas*, os quais produzem vários compostos bactericidas (SHODA, 2000). O gênero *Pseudomonas* tem sido utilizado como um bio-pesticida no EUA desde 1990, como uma estratégia para o controle de doenças de plantas, por ser cosmopolita (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009).

A atividade do controle biológico de estirpes selecionadas de *Pseudomonas* spp. é efetiva sob certas condições de campo e em casas de vegetação comerciais (TUZUN e KLOEPPER, 1995). Além do efeito antagonístico direto em patógenos de solo, algumas estirpes também são capazes de reduzir doenças na parte aérea (PIETERSE et al., 2005), sendo efetivo contra um amplo espectro de fitopatógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus.

O potencial deste gênero para suprimir fitopatógenos está nos metabólitos secundários com atividade antibiótica. Foram caracterizadas fenazinas, pirrolnitrina, antibióticos pio, derivados de indol, peptídeos, lipídeos, glicolipídeos e compostos alifáticos, que podem ser alternativas aos compostos químicos (SPAGO et al., 2014).

As fenazinas, que são análogos de coenzimas de flavina, inibem o transporte de elétrons e são conhecidas por terem vários efeitos farmacológicos sobre células animais. Na presença de ofripiochelina, as fenazinas catalisam a formação de radicais hidroxila, provocando danos em lipídios e outras macromoléculas. A pirrolnitrina foi descrita como um inibidor de cadeias respiratórias fúngicas, e tem sido utilizada como um antimicótico em medicina humana, e análogos sintéticos têm

sido desenvolvidos para utilização como fungicidas agrícolas. Lipopeptídeos cíclicos, que incluem substâncias activas de controlo biológico, bem como toxinas de pseudomonadas fitopatogénicas, têm propriedades tensioativas e são capazes de penetrar em membranas e perturbar a sua função, o que resulta em atividades antimicrobianas e antifúngicas (HAAS e DÉFAGO, 2005).

1.6 Estresse oxidativo e sistema antioxidativo de defesa

Na formação da atmosfera terrestre o acumulo de oxigênio molecular proporcionou a evolução de organismos aeróbios. Estes utilizam o O₂ como aceptor final de elétrons, pois permite elevada produção de energia na respiração, em consequência de seu alto potencial eletroquímico (AMBAR, 2008). Entretanto, devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais livres.

A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Em geral a geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO), em níveis compatíveis com o estado fisiológico considerado normal, tem um papel vital, uma vez que essas espécies atuam na regulação da sinalização celular e na expressão gênica (BERRA et al., 2006). Durante os processos metabólicos, essas ERO atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (SHAMI e MOREIRA, 2004; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A produção contínua de ERO durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (SHAMI e MOREIRA, 2004; BIANCHI e ANTUNES, 1999).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de ERO ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos, o que pode gerar danos e rápida morte celular (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

As ERO são altamente reativas, por apresentarem elétrons desemparelhados ou instabilidade em sua formulação (RIBEIRO et al., 2005). Assim, podem causar modificações em aminoácidos residuais, oxidação de grupos sulfidrilas, quebra de ligações peptídicas, perda de metais em metaloproteínas, despolimerização de ácidos nucleicos, mutações pontuais e oxidação de polissacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados (FRIDOVICH, 1995).

Um indicador de estresse oxidativo é o radical superóxido (O_2^-), gerado a partir do oxigênio molecular (O_2) por uma redução de elétron único. (HALLWELL e GUTTERIDGE, 2007). O O_2^- é mais polar que o O_2 , não atravessando membranas facilmente (IMLAY, 2013). Os principais danos causados pelo O_2^- em sistemas biológicos são a destruição de centros metálicos de proteínas, como a catalase e a glutathione peroxidase; oxidação de cadeias laterais de aminoácidos; e formação de outras espécies oxidativas como o OH^- (MITTLER, 2006).

No entanto, este radical não é altamente oxidante e exerce o seu papel tóxico por meio do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. O H_2O_2 pode capturar um elétron a partir de outra molécula livre de O_2 , de íons de ferro (Fe^{2+}) ou de cobre (Cu^{1+}), liberados, por exemplo, de proteínas oxidativamente modificados sob condições anormais, formando o radical hidroxila (OH^-), ainda mais potente (PAPAPOSTOLOU et al., 2010). Por participar da reação de geração de OH^- tem ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira diz respeito à geração de radical OH^- , por meio da reação do H_2O_2 com os íons em questão, ao passo que, na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical O_2^- , a fim de gerar, da mesma forma, o radical OH^- (KOURY e DONANGELO, 2003; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

1.7 Sistema antioxidativo de defesa

Os organismos desenvolveram mecanismos capazes de combater os efeitos danosos de ERO, por meio de sistemas antioxidativos de defesa (CABISCOL et al., 2000). O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das ERO. Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena. As defesas não enzimáticas incluem compostos com propriedades antioxidantes, as quais ajudam manter o ambiente redutor, como o Beta-caroteno, Alfa-tocoferol (Vitamina E), glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico, NADPH e NADH (CABISCOL et al., 2000). Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (KOURY e DONANGELO, 2003; CLARKSON e THOMPSON, 2000).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPx), Glutathiona redutase (GR), glutathiona S-transferase (GST) (GRATÃO et al., 2005). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, consequentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as ERO, por ser responsável pela catalise da dismutação do O_2^- , que é a primeira espécie a ser formada pela redução do O_2 por um único elétron, e também a mais abundante em sistemas aeróbicos. A principal importância da SOD se dá por ser considerada a única enzima cuja atividade controla a concentração de O_2^- e H_2O_2 , os dois substratos da reação de HABER-WEISS e FENTON que origina os radicais OH^- e provavelmente por isso, as SOD representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (RYAN et al., 2010).

A atividade da SOD muitas vezes depende da participação de cofatores enzimáticos. Tais co-fatores podem diferir de acordo com os compartimentos celulares de ação das enzimas. A SOD pode ser encontrada sob três formas: dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn), dependente do manganês como co-fator

(SOD-Mn), e dependente do ferro (SOD-Fe) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; GREEN et al., 2004).

As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical OH[•], contra o qual não há sistema enzimático de defesa (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

O referido radical (OH[•]) vem sendo indicado como o de maior potencial reativo e com extrema instabilidade (vida média de 10⁻⁹ segundos). Essas características o capacitam como o radical livre mais propício na produção de danos oxidativos. Além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica. Seu ataque ao DNA possibilita a ocorrência de mutações (WELCH et al., 2002).

2. OBJETIVOS

Avaliar o potencial de metabólitos secundários produzidos por uma linhagem bacteriana submetida a estresse por competição, em produzir estresse oxidativo no fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, por meio de indicadores enzimáticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens e condições de crescimento

Sclerotinia sclerotiorum (linhagem I20) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho (GRABICOSKI et al., 2015), da coleção mantida no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. O cultivo foi realizado em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA – 200 g/L de infusão de batatas, 20 g/L de dextrose e 15 g/L de ágar) por 7 dias e Batata Dextrose Caldo (BDC – 200 g/L de infusão de batatas, 20 g/L de dextrose) a 120 rpm por 4 dias. Incubação a 20 °C com fotoperíodo de 12 h.

Pseudomonas aeruginosa (linhagem LV) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Galdino Andrade Filho (RAMPAZO, 2004), da coleção mantida no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. O cultivo foi realizado em meio de cultura Nutriente Ágar (NA – peptona 2 g/L, extrato de carne 1.2 g/L, Ágar 15 g/L, pH 6.8) + CuCl₃ por 24 h; e Caldo Nutriente (CN – peptona 2 g/L, extrato de carne 1.2 g/L, pH 6.8) + CuCl₃ por 10 dias em aeração constante por bomba de pressão. Incubação a 28 °C no escuro. As condições de cultivo, tais como meio de cultura, pH, agitação, temperatura e tempo de incubação, foram padronizados para otimizar o crescimento da linhagem de *P. aeruginosa* LV, e a produção dos metabólitos foi patenteada (ANDRADE, 2008).

A eficiência de inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência da inibição (\%)} = (1 - \text{raio do crescimento micelial inibido} / \text{raio do crescimento micelial controle}) \times 100.$$

3.2 Obtenção de metabólitos secundários

3.2.1 Antagonismo direto

Em placas de Petri (85 mm de diâmetro) contendo meio BDA, *S. sclerotiorum* e *P. aeruginosa* foram inoculadas em extremidades opostas a 10 mm de distância da borda (ZIVKOVIC et al., 2010), e incubadas a 20 °C com fotoperíodo de 12 h por 7 dias. Inóculo com apenas o fitopatógeno foi o controle negativo do experimento, e o

crescimento fúngico foi aferido por meio de medições do raio em milímetros (mm), diariamente em triplicata.

3.2.2 Partição líquido-líquido

Após o crescimento de *P. aeruginosa* em CN + CuCl₃ (item 3.1), as células foram centrifugadas a 9.000 g, 4 °C por 20 min e o sobrenadante foi concentrado até 10 vezes o volume inicial de crescimento em rotaevaporador a 70 °C. Uma alíquota de 1 mL foi reservada para teste de difusão em ágar (item 3.3.1), e com o restante foi realizada partição líquido-líquido em funil de separação com diclorometano (Fração Diclorometano – FD), na proporção de 1:2 por 5 vezes, para total extração de metabólitos. A fração orgânica (solvente + metabólitos) foi concentrada em rotaevaporador a 40 °C até a total evaporação do solvente. A fração bruta dos metabólitos foi congelada e liofilizada por 24 h, e o rendimento foi quantificado em mg (OLIVEIRA et al., 2016).

3.2.3 Cromatografia Líquida a Vácuo – CLV

Sílica gel 60 (0.063-0.2 mm) foi adicionada e compactada em coluna de vidro de 20 mm de diâmetro e 35 cm de altura, a qual foi acoplada a uma bomba de vácuo (OLIVEIRA et al., 2016). A fração bruta dos metabólitos (item 3.2.2) foi homogeneizada na mesma sílica gel, adicionada no topo da coluna, e fracionada usando um sistema de solventes: 1º- 100% éter de petróleo; 2º - 100% diclorometano; 3º - 95% diclorometano, 5% acetato de etila; 4º - 70% diclorometano, 30% acetato de etila; 5º- 60% diclorometano, 40% acetato de etila; 6º - 100% acetato de etila; 7º - 75% acetato de etila, 25% metano; 8º - 50% acetato de etila, 50% metanol; 9º - 100% metanol. Cada banda formada foi coletada e concentrada em rotaevaporador a 50 °C, até total evaporação dos solventes.

3.3 Seleção de metabólitos secundários por difusão em ágar

3.3.1 Teste de poço

A atividade antifúngica do sobrenadante de *P. aeruginosa* foi determinada pelo ensaio de difusão em ágar, adaptado de Vasconcellos et al., (2014). Placas de meio BDA foram perfuradas em extremidades opostas, formando poços de 9 mm de diâmetro com 10 mm de distância da borda da placa, nos quais foram adicionadas

alíquotas de 150 µL de sobrenadante do crescimento de *P. aeruginosa* (item 3.2.2) filtrado em membrana de 0.45 µm em um poço, e 150 µL de CN + CuCl₃ como controle no outro poço. *S. sclerotiorum* foi inoculada ao centro da placa, e incubadas a 20 °C com fotoperíodo de 12 h por 7 dias. O crescimento fúngico foi medido em mm diariamente em triplicata.

3.3.2 Teste em discos de difusão

A avaliação da atividade antifúngica das frações foi realizada segundo protocolo adaptado de Góis et al. (2013). Em discos de papel com 9 mm de diâmetro estéreis, foram adicionadas, a fração bruta (item 3.2.2) e cada fração separada em CLV (item 3.2.3), nas concentrações 100, 250 e 500 µg/10 µL, como controle foram utilizados discos com o solvente de melhor afinidade por cada fração. Em placas com meio BDA, *S. sclerotiorum* foi inoculada ao centro, um disco contendo a fração e um disco controle foram inoculados em extremidades opostas com 10 mm de distância da borda, e incubadas a 20 °C com fotoperíodo de 12 h por 7 dias. O crescimento fúngico foi medido em mm diariamente em triplicata.

3.4 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

3.4.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC) em Agar

A fração que apresentou a melhor inibição de crescimento de *S. sclerotiorum* (obtida no item 3.3.2) foi testada para Concentração Inibitória Mínima (MIC) contra hifas e escleródios deste fungo, utilizando-se o meio BDA. A fração foi diluída em DMSO 0.5% e os experimentos consistiram de placas contendo 0 (controles BDA e BDA + DMSO); 0.098; 0.20; 0.39; 0.78; 1.56; 3.13; 6.25; 12.5; 25; 50 e 100 µg/mL da fração. Plugues de 9 mm de diâmetro contendo hifas e escleródios com aproximadamente 3 mm de diâmetro de *S. sclerotiorum* (desinfestados com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2%) foram inoculados no centro de cada placa (GONG et al., 2014).. As condições de incubação foram: 20 °C, com fotoperíodo de 12 h por 7 dias. O diâmetro do crescimento micelial foi aferido diariamente em mm, em triplicata.

3.4.2 Viabilidade de escleródios após MIC em Ágar

Os escleródios que não germinaram no teste de MIC em Ágar (item 3.4.1) foram testados para verificar se houve apenas inibição de sua germinação ou a morte dos mesmos. Para tal estes foram transferidos para placas contendo apenas meio BDA, e incubados à 20 °C, com fotoperíodo de 12 h durante 15 dias. Como controle foram utilizados escleródios recém formados. O diâmetro do crescimento micelial foi aferido diariamente em mm, em triplicata.

3.4.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC) em caldo

A fração que apresentou a melhor inibição de crescimento de *S. sclerotiorum* (obtida no item 3.3.2) foi testada para Concentração Inibitória Mínima (MIC) contra hifas deste fungo, utilizando-se o meio BDC. A fração foi diluída em DMSO 0.5% e os experimentos consistiram de erlenmeyers contendo 0 (controles BDC e BDC + DMSO); 0.098; 0.20; 0.39; 0.78; 1.56; 3.13; 6.25; 12.5; 25; 50 e 100 µg/mL da fração. Três plugues de 9 mm de diâmetro contendo hifas de *S. sclerotiorum* foram inoculados em erlenmeyers contendo 150 mL de meio BDC. As condições de incubação foram: a 120 rpm, 20 °C, com fotoperíodo de 12 h por 4 dias (THERESE et al., 2006).

3.5 Estresse oxidativo

Os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA) foram quantificados para realização dos testes de estresse oxidativo. *S. sclerotiorum* foi incubada em meio BDC acrescido da fração que apresentou a melhor inibição do crescimento fungico (obtida no item 3.3.2), nas concentrações inferiores encontradas para MIC em caldo (item 3.4.3), assim como os controles BDC e BDC + DMSO 0.5%. Após o período de crescimento (descrito no item 3.1), o micélio foi filtrado a vácuo e congelado.

3.5.1 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio

A quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinada por meio da reação de iodeto de potássio (KI). O concentrado de hifas de *S. sclerotiorum* (item 3.5) foi macerado em nitrogênio líquido (N₂), e 0.3 g do macerado foi homogeneizado com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0.1% e centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4 °C. Foram retirados 200 µL do sobrenadante, aos quais

foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio (TFP) 100 mM (pH 7.5) e 800 µL de solução iodeto de potássio (KI) 1 M. A solução foi mantida no gelo, no escuro durante 1h e então a absorbância foi aferida em espectrofotômetro a 390 nm, os resultados foram expressos em µmol de H₂O₂/g por grama de massa fresca (DOURADO et al., 2013).

3.5.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de MDA, um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), método adaptado de Health e Parker (1968). O concentrado de hifas (item 3.5) foi macerado com N₂, e 0.3 g do macerado de células foi homogeneizado com 1 mL de TCA 0.1% e centrifugado a 10.000 g por 5 min. Foram retirados 250 µL do sobrenadante, aos quais foram adicionados 1 mL de solução de TCA 20%+TBA 0.5%. A solução foi colocada em banho-maria a 97 °C durante 30 min, e então resfriada e gelo por 10 min. A absorbância foi aferida em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em µmol de MDA/g de massa fresca.

3.6 Sistema antioxidativo

3.6.1 Extração de proteínas

O concentrado de hifas (item 3.5) foi macerado em N₂ e homogeneizado em TFP 100 mM pH 7.5 contendo ácido etileno diamino tetracético 1 mM (EDTA), ditioneitol 3 mM (DTT) e polivinilpirrolidona 5% (PVPP), mantidas no gelo. Após homogeneização o material foi centrifugado a 10.000 g a 4 °C por 30 min, e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -20 °C para posteriores análises enzimáticas (OLCHANHESKI et al., 2014).

3.6.2 Quantificação de proteínas

O método descrito por Bradford (1976) foi utilizado para determinar as concentrações de proteínas totais. Utilizou-se espectrofotometria em 595 nm, e BSA ("bovine serum albumin") como padrão. Os resultados foram expressos como µmol de Proteínas/g de massa fresca.

3.6.3 Atividade das enzimas antioxidativas

As atividades das enzimas antioxidativas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) foram determinadas em eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) não desnaturante. Foram utilizados géis com 12% de poliacrilamida (AZEVEDO et al., 1998). O gel de resolução foi montado com 2.5 mL de solução de poliacrilamida 40% (Sigma), 2.5 mL de Tampão TRIS 3M pH 8.9, 4.5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 17.5 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônia 1%. Para o gel de empacotamento foi utilizada uma solução composta por 500 µL de solução poliacrilamida 40% (Sigma), 1.25 mL de Tampão Tris 500 mM pH 6.7, 2.75 mL de água, 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio 1%. O tampão de eletrodo para corrida do gel foi composto por Tris 25 mM pH 8.3 acrescido de 192 mM de glicina.

3.6.4 Atividade de SOD em PAGE não desnaturante

A atividade de SOD foi avaliada em gel de PAGE não-desnaturante. Foram aplicadas 40 µg de proteínas (item 3.6.1) no gel de PAGE não desnaturante (3.6.3) juntamente com tampão de amostra (1 mL de tampão Tris-HCl 500 mM pH 6.7, 1 mL de glicerol e 1 mL de solução 0.5% de azul de bromofenol). Os géis foram submetidos a uma corrente constante de 15 mA a 4 °C durante 3 h. Ao final do tempo de corrida, os géis foram lavados com água destilada e incubados no escuro em temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de TFP pH 7.8, EDTA 1 mM, riboflavina 0.05 mM, nitroazul tetrazólio (NBT) 0.1 mM e TEMED 0.3% durante 30 min. Após este período a mistura de reação foi descartada, os géis lavados com água destilada e expostos sob luz fluorescente para o aparecimento de bandas (Gratão et al., 2015).

3.6.5 Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não desnaturante

Para a caracterização das isoenzimas de SOD, 40 µg de proteínas (item 3.6.1), da mesma amostra, foram aplicadas com intervalos entre as aplicações, em gel de poliacrilamida (item 3.6.3), o qual foi dividido verticalmente em três partes iguais, após a corrida eletroforética. Uma parte foi imersa em TFP 100 mM pH 7.8, a segunda parte imersa em solução de TFP 100 mM pH 7.8 contendo 0.0292 g de EDTA e 0.0130 g de KCN, e a última foi imersa em uma solução de TFP 100 mM pH 7.8 acrescido de 0.0292 g de EDTA e 70 uL de H₂O₂ 30%, permanecendo imersos

nas respectivas soluções de revelação por 20 min no escuro. Os géis foram lavados em água deionizada e as três partes foram submetidos à revelação em solução contendo 50 mM de TFP pH 7.8, EDTA 1 mM, riboflavina 0.05 mM, nitroazul tetrazólio (NBT) 0.1 mM e TEMED 0.3% durante 30 min. Após este período a mistura de reação foi descartada, os géis lavados com água destilada e expostos sob luz fluorescente para revelação de bandas. As bandas foram analisadas para o tipo de isoenzima presente, conforme o fator inibidor presente nas soluções de tratamento. A classificação foi realizada como descrito por Guelfi et al. (2011): Cu/Zn-SOD quando inativada na presença de KCN e H₂O₂; Fe-SOD se a banda foi inativada somente na presença de H₂O₂, sendo resistente ao KCN; e Mn-SOD se a isoenzima foi resistente aos dois tratamentos (AZEVEDO et al., 1998).

3.6.6 Atividade de CAT em PAGE não desnaturante

Foram aplicadas 40 µg de amostras das proteínas (item 3.6.1) no gel de PAGE não desnaturante (item 3.6.3) juntamente com um tampão de amostra (1 mL de tampão Tris-HCl 500 mM pH 6.7, 1 mL de glicerol e 1 mL de solução 0.5% de azul de bromofenol). A determinação da atividade de CAT foi realizada em PAGE 12% a 4 °C durante 17h em corrente constante de 15 mA. O gel foi lavado em água destilada (3 X 15 min) e incubado por 10 min em solução de H₂O₂ 0.003% (v/v), à temperatura ambiente. Então o gel foi lavado novamente e colocado por 10 min em solução de FeCl₃ 1% e K₂Fe(CN)₆ 1% (m/v) . A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 min (PETERS et al., 2014).

3.7 Análise estatística

Os resultados do trabalho foram obtidos em triplicata para cada tratamento, e analisados estatisticamente utilizando um delineamento inteiramente casualizado. A significância das diferenças foi mensurada por meio de análise de variância ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o software Stata 12 utilizando a análise fatorial e o teste ANOVA para comparações tratamentos e períodos de crescimento utilizando a correção de Bonferroni e Fischer, e de Kruskal-Wallis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPONENTES DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE *Pseudomonas aeruginosa* COM POTENCIAL INIBITÓRIO SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum*

Janaina Emiliano¹, Elizângela Paz de Oliveira¹, Stella Marys Christóforo Hinojosa Salazar¹, Ane Stéfano Simionato², Miguel Octavio Pérez Navarro², Admilton Gonçalves de Oliveira², Sônia Alvim Veiga Pileggi¹, Galdino Andrade², Marcos Pileggi^{1*}.

¹ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. ² Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. *pileggimarcos@gmail.com.

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é o causador da doença conhecida como mofo branco. Possui ampla gama de hospedeiros, sendo o responsável por perdas significativas na agricultura. Uma vez que o uso de fungicidas tem causado problemas ambientais, o controle biológico tem sido considerado uma abordagem promissora. *Pseudomonas aeruginosa* (linhagem LV) produz metabólitos capazes de inibir o crescimento de vários microrganismos, dentre os quais estão o fitopatógeno *Xanthomonas* spp., patógenos humanos *Staphylococcus aureus*, e *Klebsiella pneumoniae*, além de interferentes de processos industriais, *Lactobacillus* sp. Linhagens com potencial antagônico, ao entrarem em contato com patógenos, podem aumentar seus níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando à morte celular. Para minimizar estes efeitos danosos, organismos desenvolveram mecanismos de combate, denominado de sistema antioxidativo de defesa. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (linhagem LV) em superar o sistema de respostas antioxidativas em *S. sclerotiorum*. A linhagem bacteriana foi isolada em lesão por cancro cítrico, região submetida a altos níveis de estresse por competição. Diferentes testes de antagonismo foram realizados por meio de difusão em ágar. Após encontrada a fração com potencial inibitório sobre o fungo, este foi submetido a testes de estresse oxidativo, com a quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e de malondialdeído (MDA); e de avaliação de sistemas de respostas antioxidativas, como a superóxido dismutase (SOD), e catalase (CAT). Nossos dados mostraram que *P. aeruginosa* produz metabólitos secundários capazes de inibir os micélios e a germinação de escleródios em *S. sclerotiorum*. Os efeitos antifúngicos dos metabólitos foram mais potentes com maiores graus de pureza. A fração F4, separada da fração bruta dos metabólitos bacterianos, aumentou os níveis de estresse oxidativo no fungo. O sistema antioxidativo de *S. sclerotiorum*

possui as isoenzimas Mn-SOD e Fe-SOD, cuja atividade somente foi detectada na presença de DMSO, e de única isoforma de CAT. As atividades gerais de SOD aumentaram nos tratamentos com a fração F4 em relação aos controles, mas sem um aumento correspondente na atividade de CAT. Assim os maiores níveis de H_2O_2 gerados em *S. sclerotiorum* não puderam ser controlados com eficiência, afetando a capacidade de crescimento e de germinação de escleródios. Por esta razão, *P. aeruginosa* apresenta um uso potencial no controle biológico de *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: estresse oxidativo, enzimas antioxidativas, peroxidação lipídica, sistemas de respostas adaptativas, controle biológico, escleródios.

Abstract

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary is known to cause the white mold disease. It has a wide range of hosts and is responsible for significant losses in agriculture. Biological control has been considered a promising approach since the use of fungicides has caused environmental problems. *Pseudomonas aeruginosa* (LV strain) produces metabolic effects of growth of several microorganisms, as to *Xanthomonas* spp. phytopathogen, *Staphilococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* human pathogen, and *Lactobacillus* sp. industrial process interferents. Strains with antagonistic potential may increase levels of reactive oxygen species (ROS) in pathogens, leading to cell death. But they try to avoid this by the antioxidant defense system. The objective of this study were evaluated the potential of secondary metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* (LV strain) in overcome the antioxidative system in *S. sclerotiorum*. The bacterial strain was isolated in citrus canker lesion, a place with high levels of competition stress. Different antagonism tests were performed through agar diffusion methods. The chemical fraction with fungus inhibitory potential was used in to oxidative stress experiments, as hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) quantification; evaluation for antioxidant responses, such as a superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). Our results showed that *P. aeruginosa* produces secondary metabolites to inhibit mycelia and a sclerotia germination, mainly in higher degrees of purity of the metabolites. The purified F4 fraction increased the levels of oxidative stress in the fungus. The antioxidant system of *S. sclerotiorum* is constituted by Mn-SOD and Fe-SOD, which activity was only detected in the presence of DMSO, and a single CAT isoform. In general, SOD activities were higher in F4 fraction treatments than in control, but with no corresponded increase in CAT activity. As a consequence, there was an increase in H_2O_2 level, affecting a mycelial growth and sclerotia germination. For this reason, we consider that *P. aeruginosa* presents potential of use in the biological control of *S. sclerotiorum*.

Keywords: oxidative stress, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, adaptive response systems, biological control, sclerotia.

4.1 INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, causador da doença em plantas conhecida como mofo branco ou podridão branca, é um fungo filamentoso cosmopolita e necrotrófico. Possui pouca especificidade de hospedeiros, em uma gama que inclui mais de 400 espécies de plantas, responsável por sérias perdas anuais de muitas culturas economicamente importantes, entre as quais a soja, feijão, canola, alface, girassol, grão de bico, amendoim, ervilha seca, lentilha, entre outras culturas (KABBAGE et al., 2015; BOLTON et al., 2006; BOLAND e HALL, 1994).

A doença tem como características o desenvolvimento de micélio branco em caule e frutos, e a formação de escleródios (agregados de hifas com camada exterior contendo melanina, é uma forma de resistência do fungo) em tecidos infectados da planta ou no solo. Neste último, passa até 90% de seu ciclo de vida, (ONARAN e YANAR, 2011) o que equivale a 8 anos, ou até o momento em que encontram condições adequadas (alta umidade, temperatura amena, 18 a 22°C, e luminosidade moderada) para a germinação. Esta pode ser miceliogênica, na qual serão produzidas hifas, infectando diretamente os tecidos da planta, ou carpogênica, com a produção de apotécios, os quais liberam ascósporos infecciosos. O maciço potencial reprodutivo, juntamente com capacidade de sobrevivência a longo prazo, faz dos escleródios componentes centrais na epidemiologia da doença (BOLTON et al., 2006).

Rotação de culturas agrícolas e pulverização de fungicidas são os principais métodos para controlar o mofo branco (LI et al., 2006). A rotação de culturas não resolve o problema, devido à persistência dos escleródios no solo (FERNANDO et al., 2007). Já o uso intensivo de fungicidas tem causado sérios problemas ambientais e aumentado a frequência e distribuição de isolados fúngicos resistentes. Assim o controle biológico tem sido considerado como uma abordagem promissora (LI et al., 2006).

O uso de microrganismos para o manejo de pragas na agricultura é uma das mais eficientes estratégias de controle biológico. Os efeitos benéficos são dependentes da linhagem e as vantagens para a planta associada incluem a supressão do patógeno usando uma variedade de mecanismos (por exemplo, antibiose, parasitismo, competição por nutrientes, etc.), a promoção do crescimento da planta e a melhoria da resistência do hospedeiro para ambos estresses bióticos e abióticos (VINALE, et al, 2014).

Vários micro-organismos já são comercializados para serem utilizados como controle biológico de *S. sclerotiorum*, como os fungos *Trichoderma harzianum*, *Coniothyrium minitans*, e as bactérias *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* e *Bacillus subtilis* (ONARAN e YANAR, 2011). Os gêneros bacterianos mais importantes utilizados como agentes de controle biológico são *Bacillus* e *Pseudomonas*, os quais produzem vários compostos bactericidas (SHODA, 2000).

O gênero *Pseudomonas* tem sido utilizado como um bio-pesticida no EUA desde 1990, como uma estratégia para o controle de doenças de plantas, por ser cosmopolita (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009). Linhagens com potencial antagonico ao entrarem em contato com patógenos podem aumentar a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) nestes, podendo levar as células a um estado de estresse oxidativo, no qual a geração e a degradação das ERO na célula estão desbalanceadas, o que pode gerar danos e rápida morte celular (FERGUSON, 1999; ZABLOTOWICKS et al., 1995). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (linhagem LV) em superar o sistema de respostas antioxidativas em *S. sclerotiorum*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Linhagens e condições de crescimento

O patógeno *S. sclerotiorum* coletado e isolado de campos de soja infectados (GRABICOSKI et al., 2015), foi cultivado em Batata Dextrose Ágar (BDA – 200 g/L de infusão de batatas, 20 g/L de dextrose e 15 g/L de ágar) à 20 °C com fotoperíodo de 12 h, estocado em tubos contendo solução salina 0.9% (9 g/L de NaCl) com plugues de hifas, armazenados à 8 °C, e mantida na coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil.

A bactéria antagonista *P. aeruginosa* linhagem LV, isolada de lesão de cancro cítrico em folhas de plantas de laranja (RAMPAZO, 2004), foi cultivada em Nutriente Ágar (NA – 2 g/L de peptona, 1.2 g/L de extrato de carne e 15 g/L de ágar) acrescido de 5 mg/L de cloreto de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à 28 °C, estocada em glicerol 30%, armazenados à -20 °C, e mantida na coleção do Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

4.2.2 Produtos químicos e meios de cultura

Todos os produtos químicos utilizados para a extração e a purificação foram de grau analítico. Sílica gel de Macherey-Nagel GmbH & Co.KG. Discos de papel estéreis da LABORCLIN - Produtos para Laboratórios Ltda. Meios microbiológicos de Becton Dickinson e Company, e Himedia Laboratories Pvt. Ltd.

4.2.3 Eficiência de inibição

A eficiência de inibição (EI) micelial e germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* foram calculadas usando a seguinte formula:

$$EI(\%) = \left(1 - \frac{RMI}{RMC}\right) \times 100$$

Na qual RMI representa o raio do crescimento micelial inibido (medida em mm), e RMC o raio do crescimento micelial controle (medida em mm) (ZHANG et al., 2016).

4.2.4 Antagonismo direto

Em placas de Petri de 85 mm de diâmetro contendo meio BDA, *S. sclerotiorum* e *P. aeruginosa* foram inoculadas na mesma placa em extremidades opostas, à 10 mm de distância da borda (ZIVKOVIC et al., 2010), e incubados à 20 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante 7 dias. Placas inoculadas apenas com o fitopatógeno foram utilizadas como controle. O raio do crescimento micelial fúngico foi medido em mm diariamente, e a eficiência da inibição micelial foi calculada. O experimento foi repetido três vezes, em triplicatas para cada tratamento.

4.2.5 Produção e purificação de metabólitos com atividade antifúngica

4.2.5.1 Condições iniciais para extração dos metabólitos

As condições de cultivo, tais como meio de cultura, pH, agitação, temperatura e tempo de incubação, foram padronizados para otimizar o crescimento da linhagem de *P. aeruginosa* LV, e a produção dos metabólitos foi patenteada (ANDRADE, 2008). Quando a cultura chegou na fase logarítmica (10^8 UFC/mL, DO 0.009 = 590 nm) 100 µL da suspensão de células foi inoculada em 1 L de Caldo Nutriente (CN - 2

g/L de peptona, 1.2 g/L de extrato de carne) acrescido de 5 mg/L de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e incubada a 28°C no escuro, durante 10 dias em aeração constante por bomba de pressão. A cultura foi centrifugada à 9000 g por 20 min à 4 °C, e o sobrenadante livre de células foi concentrado em rotaevaporador até 10 vezes o volume inicial, e este foi submetido a partição líquido-líquido com diclorometano (Fração Diclorometano - FD), na proporção 1:2 (100 mL de sobrenadante para 200 mL de diclorometano) em funil de separação por 5 vezes, para total extração dos metabólitos de *P. aeruginosa*, e concentrada em rotaevaporador (OLIVEIRA et al., 2016).

4.2.5.2 Purificação por Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV)

O processo de purificação de FD prosseguiu em CLV, que consiste em coluna de vidro (35 cm de comprimento com 2 cm de diâmetro) preenchida com aproximadamente 30 g de sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm) acoplada a uma bomba à vácuo com ~150 mm/Hg. O fracionamento de FD (item 4.2.5.1) foi feito por meio das fases móveis (v/v): éter de petróleo:benzeno:éter etílico (45:50:5% - F1), diclorometano (100% - F2), diclorometano:acetato de etila (95:5% - F3 e F4), diclorometano:acetato de etila (70:30% - F5), diclorometano:acetato de etila (60:40% - F6), acetato de etila (100% - F7), acetato de etila:metanol (75-25% - F8), acetato de etila:metanol (50-50% - F9), metanol (100% - F10). Quarenta mililitros de cada solvente foram adicionados na coluna por 10 vezes, e cada fração coletada foi concentrada em rotaevaporador (OLIVEIRA et al., 2016). A atividade antifúngica foi monitorada por testes de disco difusão.

4.2.6 Análises biológicas

4.2.6.1 Avaliação da atividade antifúngica por teste de poço

A atividade antifúngica do sobrenadante de *P. aeruginosa* foi determinada pelo ensaio de difusão em ágar, adaptado de Vasconcellos et al., (2014). Placas de meio BDA foram perfuradas em extremidades opostas com 10 mm de distância da borda, formando poços de 9 mm de diâmetro, nos quais foram adicionadas alíquotas de 150 µL de sobrenadante concentrado do crescimento de *P. aeruginosa* (item 4.2.5.1) filtrado em membrana de 0.45 µm, e 150 µL de CN + CuCl_3 como controle negativo. *S. sclerotiorum* foi inoculada ao centro de cada placa, e incubadas à 20 °C, com

fotoperíodo de 12h, durante 7 dias. O raio do crescimento micelial fúngico foi medido em mm diariamente, e a eficiência da inibição micelial foi calculada. O experimento foi repetido três vezes, em triplicatas para cada tratamento.

4.2.6.2 Seleção de compostos com atividade antifúngica por teste de disco difusão

A avaliação da atividade antifúngica das frações foi realizada segundo protocolo adaptado de Góis et al. (2013). Discos de papel estéreis, com 9 mm de diâmetro e capacidade de 10 µL, foram preparados com diferentes concentrações das frações brutas e semi-purificadas (item 4.2.5.2) (100, 250 e 500 µg/disco de FD e de cada fração separada em CLV, F1-F10). Os discos (com a fração e controle) foram inoculados em extremidades opostas, à 10 mm de distância da borda de placas com meio BDA. *S. sclerotiorum* foi inoculada ao centro de cada placa, e incubadas à 20 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante 7 dias. Discos contendo apenas solvente (com melhor afinidade por cada fração) foram utilizados como controle negativo. O raio do crescimento micelial fúngico foi medido em mm diariamente, e a eficiência da inibição micelial foi calculada. O experimento foi repetido três vezes, em triplicatas para cada tratamento.

4.2.6.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC) em ágar

A fração separada por CLV que apresentou maior inibição e melhor estabilidade sobre o crescimento de *S. sclerotiorum* (item 4.2.6.2) foi diluída em DMSO 0.5%, homogeneizada em BDA nas concentrações de 0.098 à 100 µg/mL e preparadas placas de Petri de 85 mm (GONG et al., 2014). Plugues de 9 mm de diâmetro contendo hifas, e escleródios com aproximadamente 3 mm de diâmetro (desinfestados com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2%) de *S. sclerotiorum* foram inoculados no centro de cada placa, e incubadas à 20 °C, com fotoperíodo de 12 h durante 7 dias. Placas contendo apenas BDA e BDA+DMSO 0.5% foram utilizadas como controle. O diâmetro do crescimento micelial fúngico foi medido em mm diariamente, e a eficiência da inibição micelial foi calculada. O experimento foi repetido três vezes, em triplicatas para cada tratamento.

4.2.6.4 Viabilidade de escleródios após MIC em ágar

Os escleródios que não germinaram no teste de MIC (item 4.2.6.3), foram reinoculados no centro de placas contendo apenas BDA, para verificar se após tratados com a fração escolhida, ainda eram viáveis. Como controle foram utilizados escleródios recém formados. As placas foram incubadas à 20 °C, com fotoperíodo de 12 h durante 15 dias. O diâmetro do crescimento micelial fúngico foi medido em mm diariamente, e a eficiência da inibição micelial foi calculada. O experimento foi repetido três vezes, em triplicatas para cada tratamento.

4.2.6.5 Concentração Inibitória Mínima (MIC) em caldo

Plugues de 9 mm de diâmetro contendo hifas de *S. sclerotiorum* foram inoculados em erlenmeyers contendo 150 mL de Batata Dextrose Caldo (BDC - 200 g/L de infusão de batatas e 20 g/L de dextrose), homogeneizados com a fração separada por CLV que apresentou maior inibição e melhor estabilidade sobre o crescimento de *S. sclerotiorum* (item 4.2.6.2), diluída em DMSO 0.5% nas concentrações de 0.098 à 100 µg/mL, e incubados à 20 °C, com fotoperíodo de 12 h, à 120 rpm, durante 4 dias. Erlenmeyers contendo apenas BDC e BDC+DMSO 0.5% foram utilizados como controle (THERESE et al., 2006). O experimento foi repetido três vezes, em triplicatas para cada tratamento.

4.2.7 Avaliação de estresse oxidativo

A avaliação de estresse oxidativo em *S. sclerotiorum* foi realizado por meios da quantificação de espécies reativas de oxigênio peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e do ácido malondialdeído (MDA). Após o período de crescimento fúngico em BDC nas concentrações suportadas da fração com maior inibição e melhor estabilidade (item 4.2.6.5) sobre o crescimento de *S. sclerotiorum*, o micélio foi filtrado à vácuo, macerado em nitrogênio líquido, e 0.3 g do macerado foi armazenado em -20 °C.

4.2.7.1 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio

A quantificação de H₂O₂ foi determinada por meio da reação de iodeto de potássio (KI). O macerado de células (item 4.2.7) foi homogeneizado com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0.1%, centrifugados à 10000 g por 15 min à 4 °C, e 200 µL do sobrenadante foi homogeneizado com 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7.5) e 800 µL de solução de IK 1M. A solução foi mantida no gelo, no

escuro durante 1 h, e então a absorbância foi aferida em espectrofotômetro à 390 nm. Os resultados foram expressos em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ de massa fresca. O experimento foi repetido três vezes, em triplicatas para cada tratamento (DOURADO et al., 2013).

4.2.7.2 Quantificação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de MDA, um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), método adaptado de Health e Parker (1968). O macerado de células (item 4.2.7) foi homogeneizado em 1 mL de TCA 0.1%, centrifugado à 10000 *g* por 5 min, e 250 μL do sobrenadante foi homogeneizado com 1 mL de solução de TCA 20%+TBA 0.5%. A solução foi colocada em banho-maria a 97 °C durante 30 min e resfriada em gelo por 10 min. A concentração de MDA foi monitorada em 535 nm (todos os lipídios) e 600 nm (todos os lipídios exceto MDA), calculada usando um coeficiente de extinção de 155 mM/cm. A quantidade de MDA foi expressa como μmol de MDA/g de massa fresca. O experimento foi repetido três vezes, em triplicatas para cada tratamento.

4.2.8 Avaliação do sistema antioxidativo de resposta

A avaliação do sistema antioxidativo de respostas de *S. sclerotiorum* foi avaliado por meio da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT), em análises eletroforéticas sob condições não-desnaturante em gel de poliácridamida à 12%, a uma corrente constante de 15 mA/gel durante 3 h (SOD) e 17 h (CAT) à 8 °C (OLCHANHESKI et al., 2014; PETERS et al., 2014).

4.2.8.1 Extração de proteínas

Após o período de crescimento de *S. sclerotiorum* na presença da fração com maior inibição e melhor estabilidade (item 4.2.6.5) sobre o crescimento de *S. sclerotiorum*, nas concentrações suportadas, o micélio foi filtrado à vácuo, macerado em nitrogênio líquido, e homogeneizado em (5:1 w/v) tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7.5) contendo ácido etileno diamino tetracético 1 mM (EDTA), ditiotreitól 3 mM (DTT) e polivinilpirrolidona 5% (PVPP), e mantidas em gelo. Após homogeneização o material foi centrifugado à 10000 *g* à 4 °C por 30 min, e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas à -20 °C para posteriores análises enzimáticas (OLCHANHESKI et al., 2014). A concentração de proteínas foi

quantificada usando o método descrito por Bradford (1976), usando "Bovine Serum Albumin" (BSA) como padrão. Os resultados foram expressos como μmol de Proteínas/g de massa fresca.

4.2.8.2 Determinação da atividade de SOD por eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE)

Após a separação das enzimas em PAGE não-desnaturante (item 4.2.8), o gel foi lavado em água destilada, e incubado no escuro durante 30 min em tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7.8) contendo EDTA 1 mM, riboflavina 0.05 mM, nitroazul tetrazólio (NBT) 0.1 mM e N,N,N,N-tetramethylenediamine (TEMED) 0.3%. Em seguida o gel foi exposto à luz branca e imerso em água destilada até o desenvolvimento das bandas de SOD. A caracterização das isoenzimas de SOD foram distinguidas pela sua sensibilidade à inibição por cianeto de potássio 2 mM e peróxido de hidrogênio 5 mM (Gratão et al., 2015).

4.2.8.3 Determinação da atividade de CAT

A atividade de CAT em PAGE não-desnaturante (item 4.2.8) foi determinada como descrito por Peters et al. (2014). Após a separação das enzimas, o gel foi incubado em 0.003% de H_2O_2 durante 10 min e em seguida, em solução contendo 1% de cloreto férrico (FeCl_3) e 1% de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN}_6)$) também por 10 min.

4.2.9 Análise estatística

Os resultados do trabalho foram obtidos em triplicata para cada tratamento, e analisados estatisticamente utilizando um delineamento inteiramente casualizado. A significância das diferenças foi mensurada por meio de análise de variância ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o software Stata 12 utilizando a análise fatorial e o teste ANOVA para comparações tratamentos e períodos de crescimento utilizando a correção de Bonferroni e Fischer, e de Kruskal-Wallis.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Avaliação do efeito antifúngico in vitro

4.3.1.1 Inibição por antagonismo direto

A linhagem de *P. aeruginosa* (linhagem LV), foi isolada em lesão por cancro cítrico, região submetida a altos níveis de estresse por competição, sendo um possível produtor de metabólitos secundários com potencial antagônico (OLIVEIRA et al., 2011); foi avaliada para efetividade de produção de biocidas, característicos deste gênero, contra uma linhagem fitopatogênica, *S. Sclerotiorum*, por meio do teste de antagonismo direto.

Os resultados do ensaio de cultura dupla mostraram que *P. aeruginosa* inibe o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* ($p < 0.000$ – Anexo A, Sessão 1.5) em 41%, mantendo-se estável até o final da avaliação (Fig 1A). Ainda foi observado que a formação de escleródios também é afetada, estes sendo formados apenas na extremidade oposta ao confronto (Fig 1B).

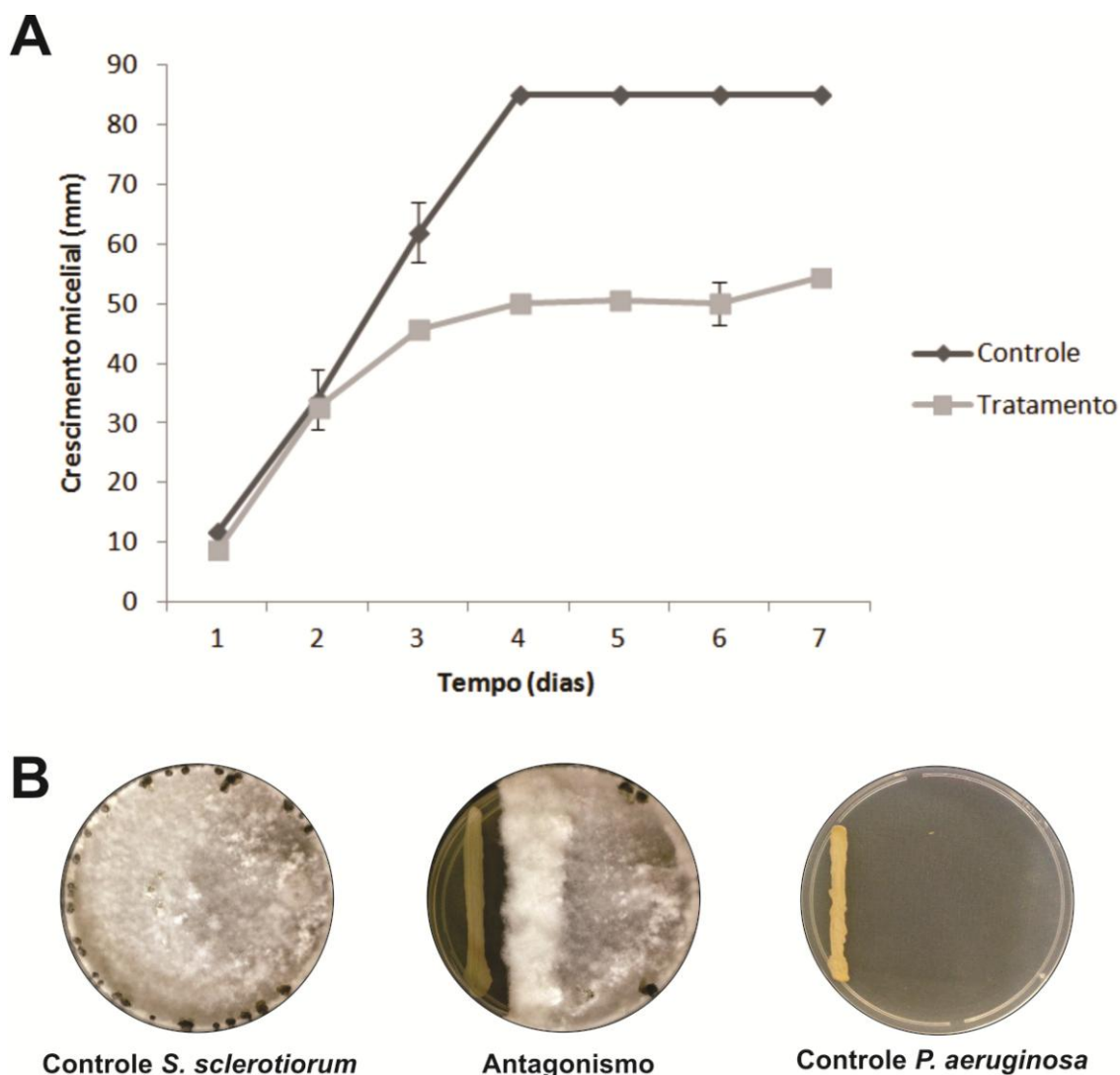


Figura 1 – Antagonismo direto entre *S. sclerotiorum* e *P. aeruginosa*. **A**: avaliação diária do crescimento fungico no controle e confronto. **B**: placas com inóculo de ambos controles e de configuração de antagonismo com 7 dias de incubação.

Estes dados corroboram os trabalhos que indicam que *P. aeruginosa* possui potencial de inibição sobre *S. sclerotiorum* *in vitro*, assim como a supressão da germinação de escleródios (Deshwal et al., 2011; Gupta et al., 2005).

4.3.1.2 Inibição por metabólitos secundários em teste de poço

Uma vez confirmada a inibição, buscou-se caracterizar se esta ocorreu por meio da produção de metabólitos secundários excretados por *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos em teste de poço mostraram que o sobrenadante concentrado bacteriano foi capaz de inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* ($p < 0.000$ – Anexo A, Sessão 2.1) (Fig 2A) em 52%, porém a inibição não manteve-se estável até o final do experimento, ou seja, o fungo continuou seu desenvolvimento, crescendo por toda a placa (Fig 2B).

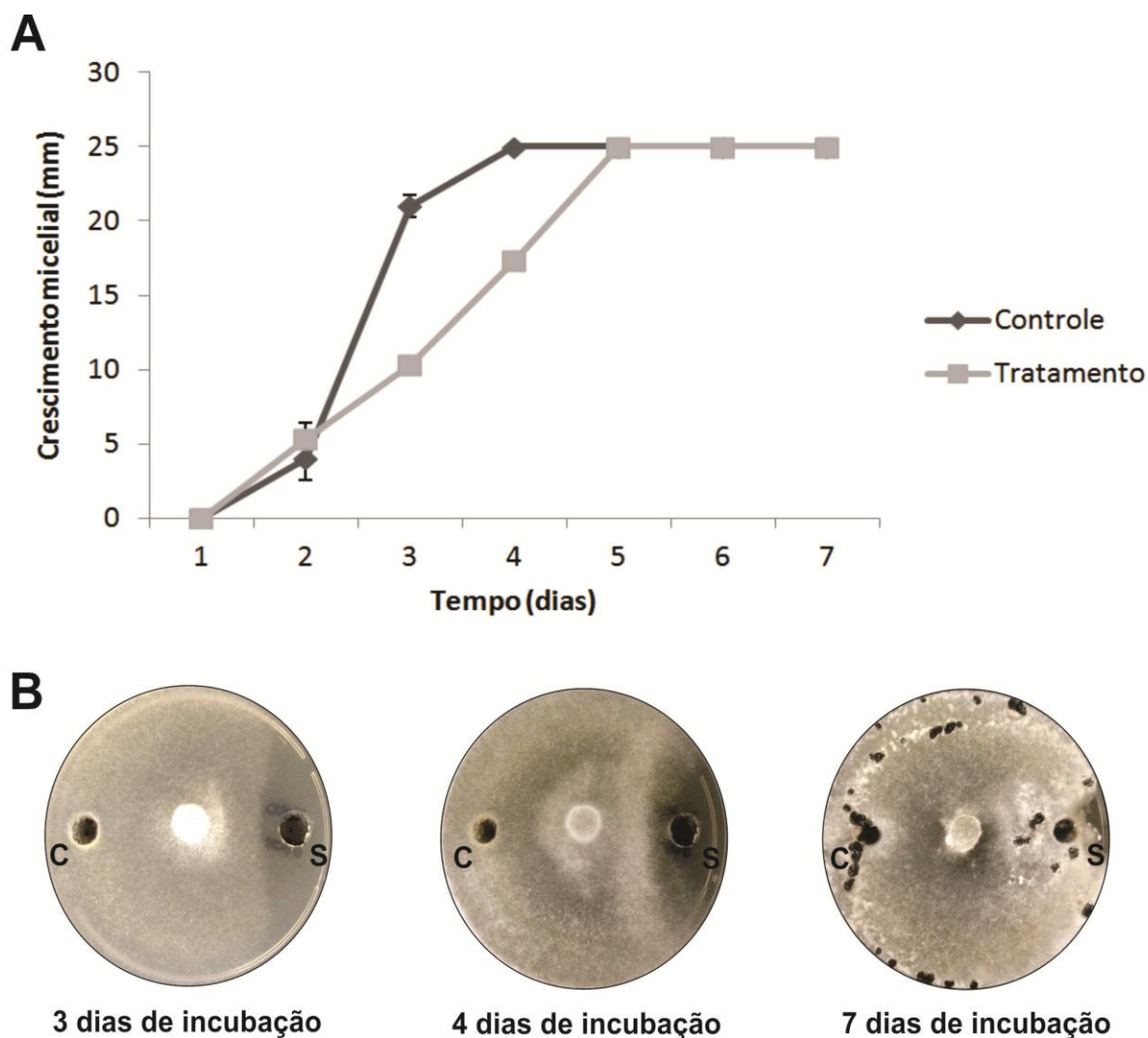


Figura 2 – Teste de poço utilizando o sobrenadante concentrado de *P. aeruginosa* sobre o crescimento de *S. sclerotiorum*. **A**; avaliação diária do crescimento fúngico no controle e tratamento. **B**: inibição fúngica em diferentes tempos de incubação, onde **C** é o poço controle contendo CN + CuCl_3 e **S** é o poço contendo sobrenadante bacteriano concentrado.

Espécies de *Pseudomonas* possuem grande potencial para suprimir agentes patogênicos de plantas, devido a produção de metabólitos secundários bacteriano com forte atividade antibiótica, incluindo fenazinas, antibióticos do tipo pirrolitrina, compostos pyo, derivados de indol, peptídeos, glicolipídios, lipídios e compostos alifáticos (HAAS e DÉFAGO, 2005).

Porém a maior parte dos trabalhos realizados contra *S. sclerotiorum* utilizam subprodutos de *Bacillus subtilis* (Wang et al., 2016; Wang et al., 2015; Ji et al., 2016), nos quais os halos de inibição são menores dos que os observados em nosso trabalho, denotando o potencial biotecnológico de *P. aeruginosa* LV.

4.3.1.3 Avaliação da atividade antifúngica de FD e frações F por técnicas de ágar difusão in vitro

Assim que verificado que *P. aeruginosa* produz metabólitos secundários com atividade antifúngica, estes foram extraídos (FD), purificados (F1-F10), e monitorados quanto ao grau de inibição de cada fração. A fração FD apresentou inibição de *S. sclerotiorum* em todos os tratamentos, porém a concentração de 500 µg mostrou maiores níveis de inibição ($p < 0.000$ – Anexo A, Sessão 3.1) (Fig. 3A), chegando a 81%, todavia esta foi diminuindo ao longo do experimento ($p < 0,000$ – Anexo B, Sessão 3.4), estabilizando em 28% de inibição (Fig 3B).

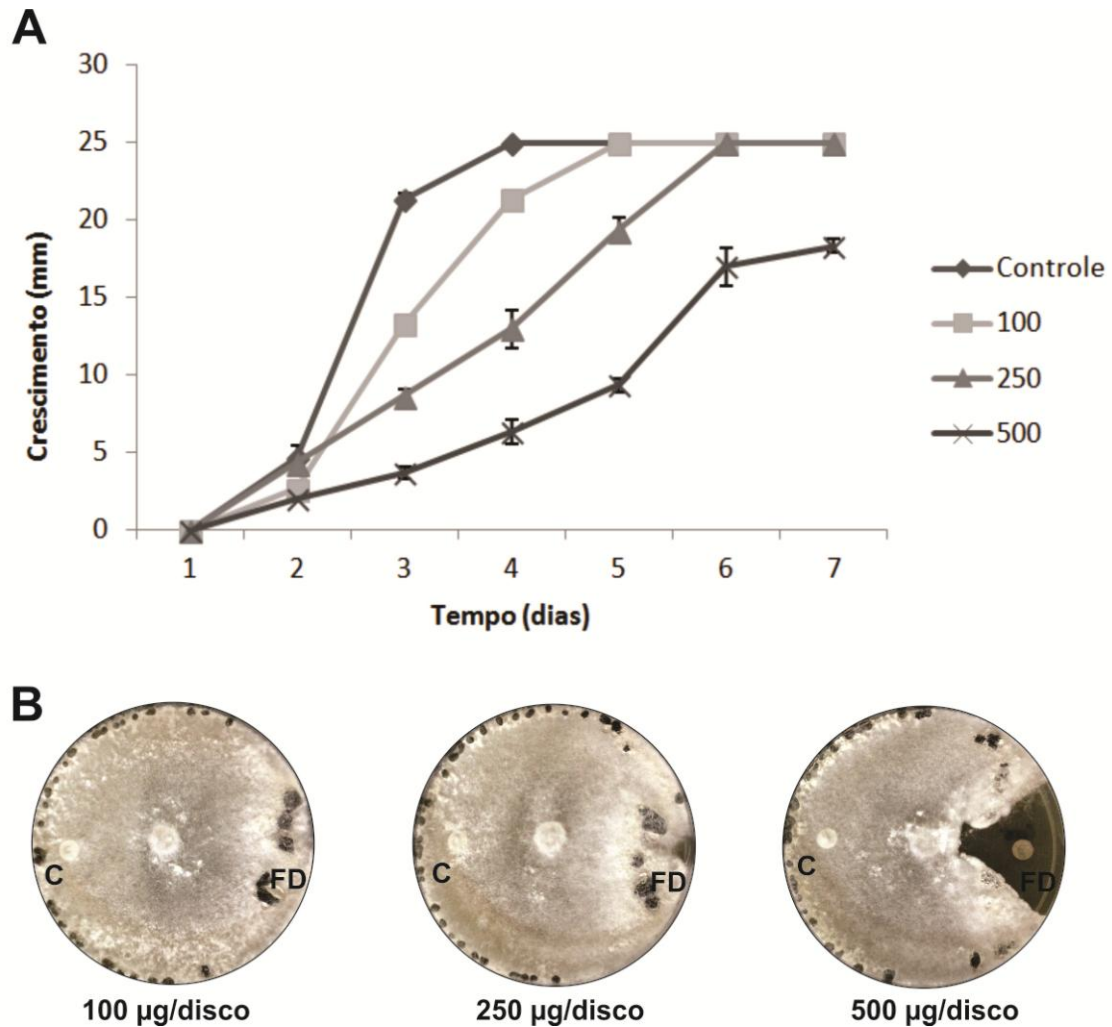


Figura 3 – Teste de disco utilizando a fração bruta dos metabólitos isolados de *P. aeruginosa* sobre *S. sclerotiorum*. **A**: avaliação diária do crescimento fúngico na presença de discos em diferentes concentrações de fração bruta. **B**: inibição de *S. sclerotiorum* onde **C** é o disco controle contendo diclorometano e **FD** o disco contendo a fração bruta em diferentes concentrações, no sétimo dia de avaliação.

Das 10 frações obtidas em CLV, apenas F3, F4 e F5 apresentaram potencial inibitório sobre *S. sclerotiorum*. Porém somente a fração F4 mostrou maior halo de inibição e maior estabilidade sobre o fitopatógeno em todas as concentrações ($p < 0.000$ – Anexo A, Sessão 5.2) (Fig. 4B), chegando a 92% no terceiro dia de avaliação e mantendo 88% de inibição na concentração 500 µg até o final do experimento ($p < 0,001$ - Anexo B, Sessão 5.5) (Fig. 4A).

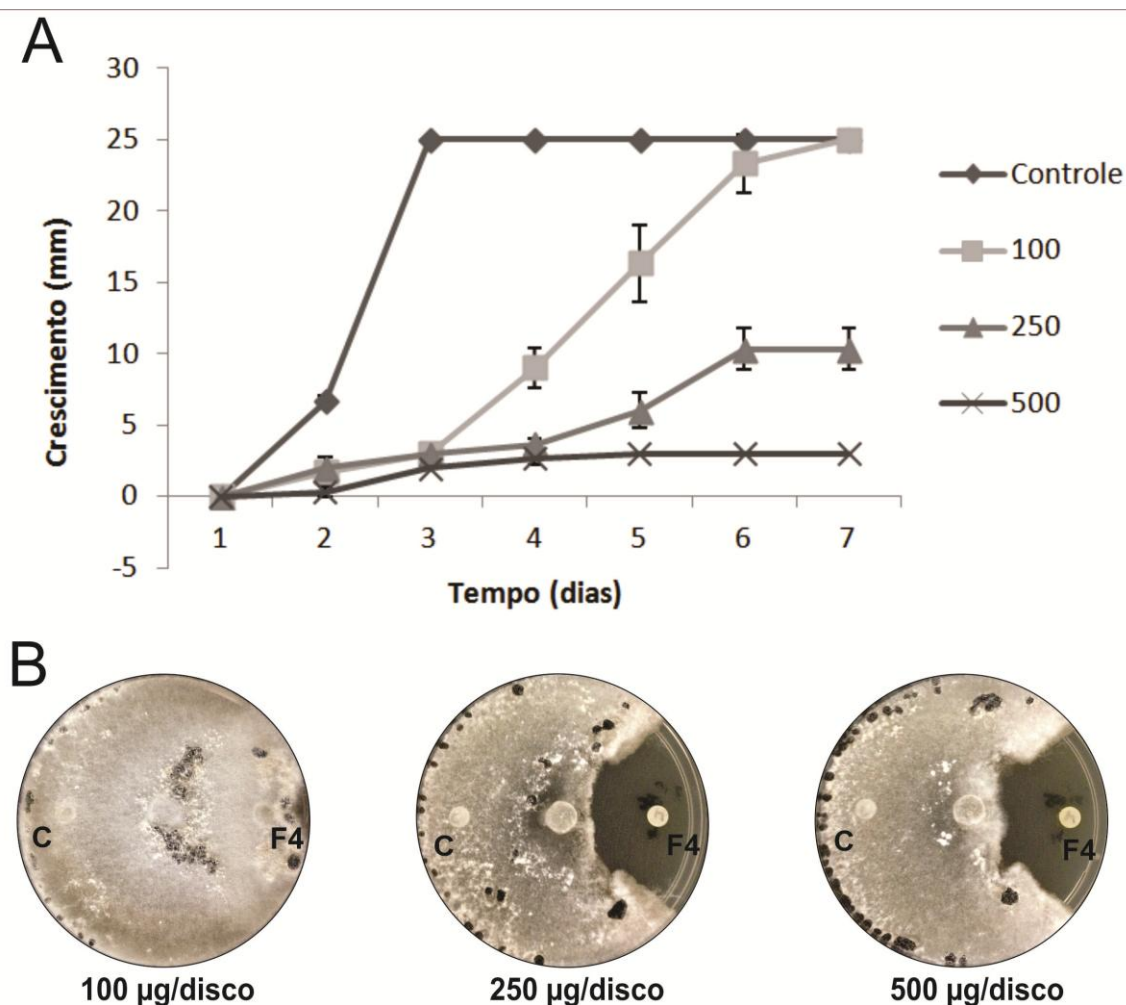


Figura 4 - Teste de dico utilizando a fração F4 em contraposição ao crescimento de *S. sclerotiorum*. **A**: avaliação diária do crescimento fúngico na presença de discos em diferentes concentrações da fração F4. **B**: inibição de *S. sclerotiorum* onde **C** é o disco controle contendo diclorometano e **F4** é o disco contendo a fração F4 em diferentes concentrações, no sétimo dia de avaliação.

Testes utilizando metabólitos secundários de *P. aeruginosa* (linhagem LV) foram realizados contra várias linhagens bacterianas, para as quais observaram-se inibição nas taxas de crescimento: fitopatógeno *Xanthomonas citri* (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016; MURATE et al., 2015), *X. axonopodis* (LOPES et al., 2012) e *X. arboricola* (VASCONCELLOS et al., 2014; SPAGO et al., 2014;), patógenos humanos *Staphilococcus aureus* (MRSA) (CARDOZO et al., 2013;) e *Klebsiella pneumoniae*, além de interferentes de processos industriais, *Lactobacillus* sp (GÓIS et al., 2013) nos quais observaram-se inibição de crescimentos.

4.3.1.4 MIC da fração F4 sobre o crescimento de *S. sclerotiorum* e viabilidade de escleródios

Por apresentar o maior potencial antagonístico e maior estabilidade, a fração F4 foi a escolhida para a realização do teste de MIC utilizando hifas e escleródios de *S. sclerotiorum*. No MIC utilizando hifas, o crescimento do fitopatógeno foi afetado a partir da concentração 3.13 µg/mL com 13% de inibição ($p < 0.000$ – Anexo A, Sessão 10.3) (Fig. 5B), diminuindo progressivamente nas demais concentrações, até o momento em que o fungo não apresenta crescimento, caracterizando o MIC em 50 µg/mL ($p < 0.000$ – Anexo A, Sessão 10.7) (Fig. 5A).

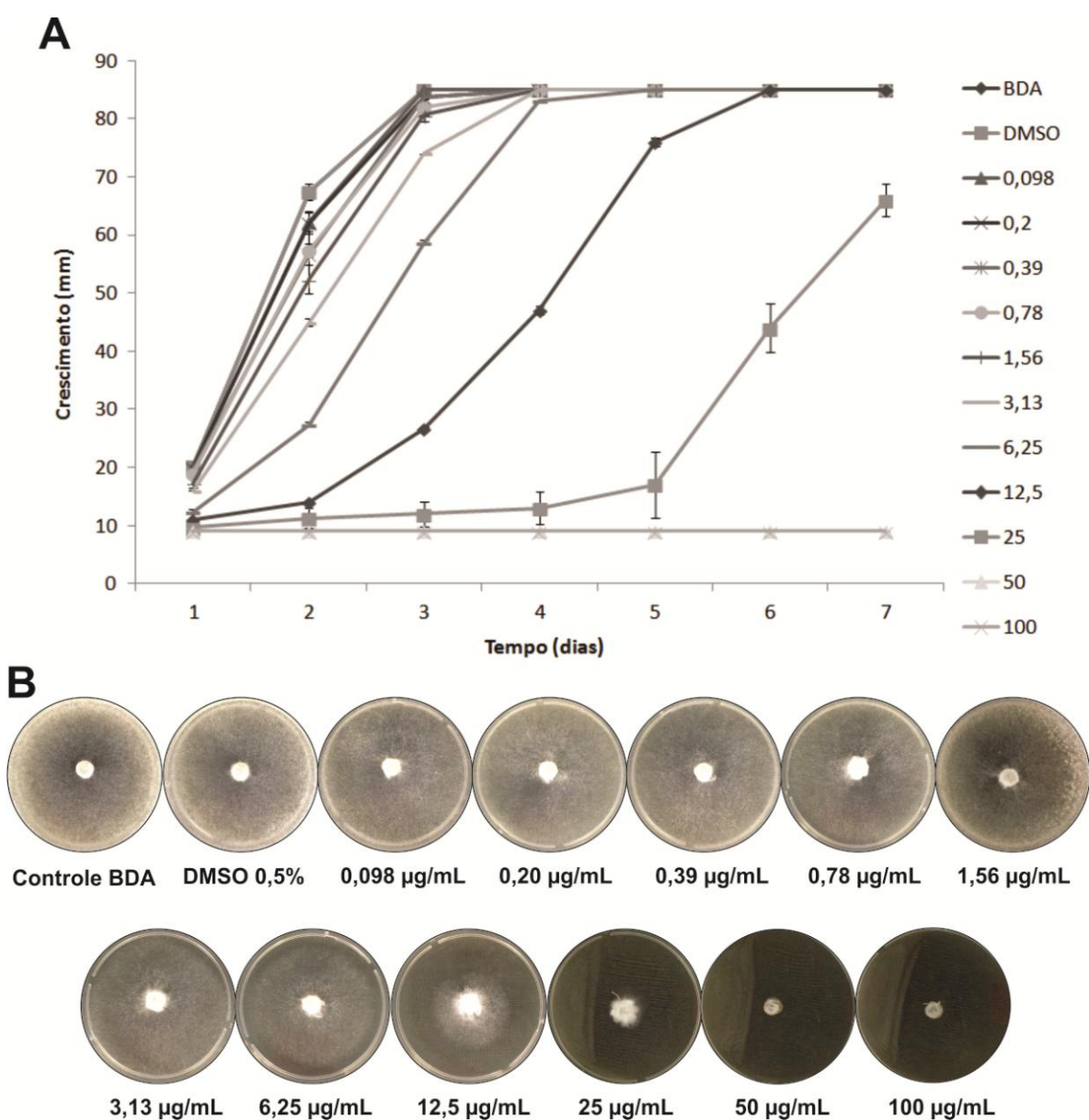


Figura 5 – MIC da fração F4 em relação ao crescimento de hifas de *S. sclerotiorum*. **A**: avaliação diária do crescimento fúngico na presença da fração F4 em diferentes concentrações. **B**: inibição de *S. sclerotiorum* pela fração F4 no terceiro dia de avaliação.

No teste de MIC para a germinação miceliogênica de escleródios, o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* foi afetado a partir da concentração 1.56 µg/mL de fração F4 ($p < 0.000$ – Anexo A, Sessão 11.3) (Fig. 6B) com 32% de inibição, onde o desenvolvimento nas demais concentrações é diminuído progressivamente, até o momento em que não ocorre germinação dos escleródios, caracterizando o MIC também em 50 µg/mL ($p < 0.000$ – Anexo A, Sessão 11.7) (Fig. 6A).

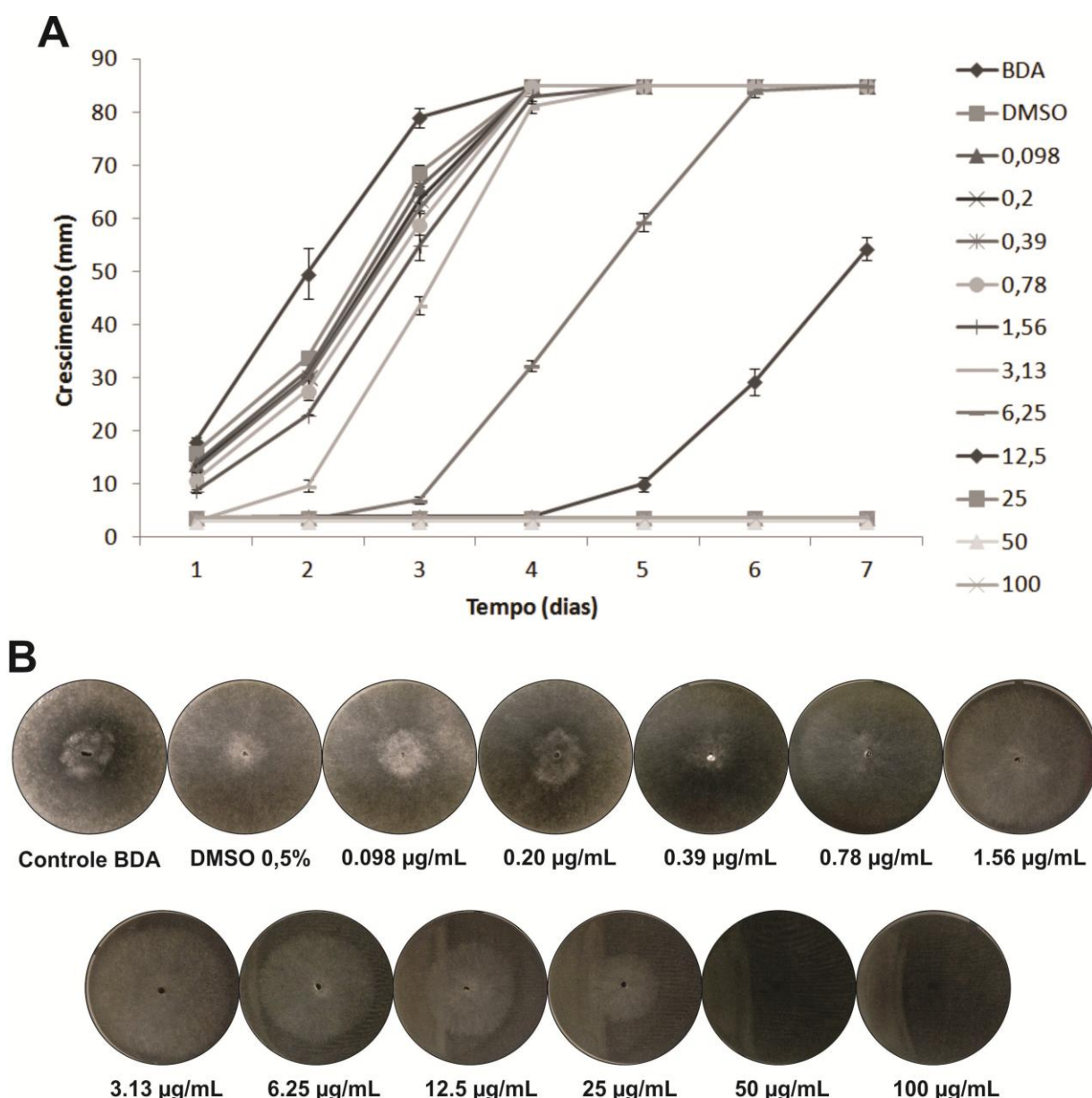


Figura 6 – MIC da fração F4 em relação à germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*. **A**: avaliação diária do crescimento fúngico na presença da fração F4 em diferentes concentrações. **B**: inibição de *S. sclerotiorum* pela fração F4 no terceiro dia de avaliação.

Os escleródios que não germinaram nas concentrações após o MIC, foram testados quanto a sua viabilidade após o tratamento com a fração F4. Ao final dos

15 dias de incubação foi constatado que não houve a germinação destes escleródios (Fig. 7), sendo considerados inviáveis para o desenvolvimento da doença, demonstrando que a fração F4 pode ser utilizada no controle do mofo branco, principalmente inibindo a formação e germinação de escleródios.

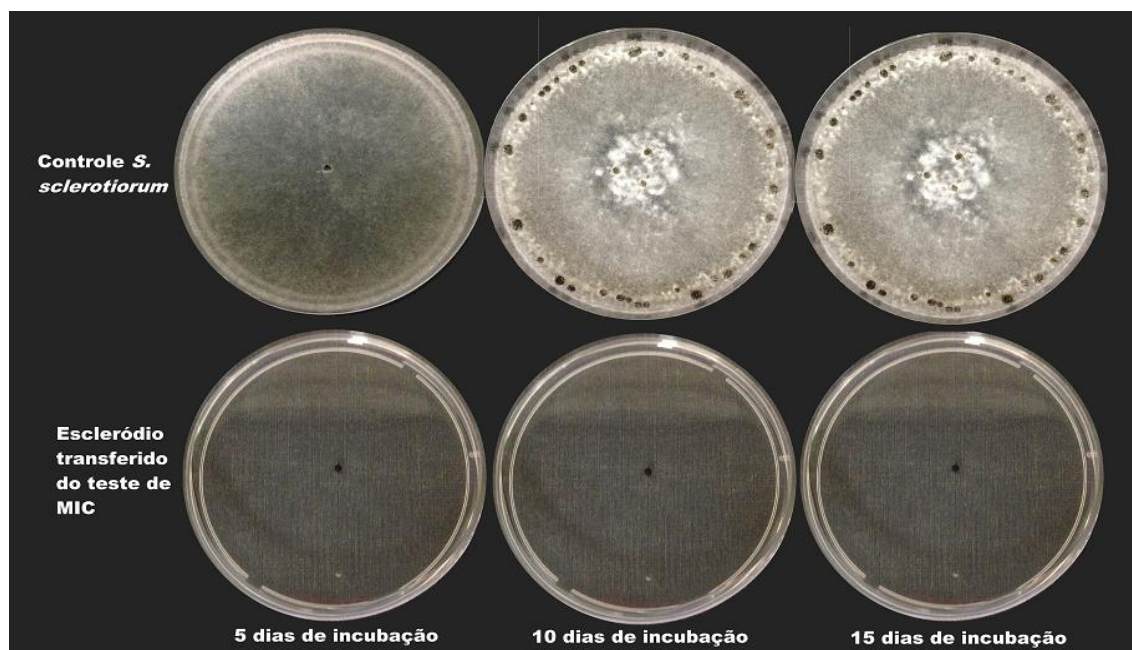


Figura 7 – Viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* após teste de MIC em relação à germinação carpopêgica. **Controle *S. sclerotiorum***: avaliação da germinação de escleródios que não passaram pelo teste de MIC; **Escleródio transferido**: avaliação da germinação de escleródio que não apresentou crescimento no teste de MIC com 50 µg/mL da fração F4.

4.3.2 Avaliação do estresse oxidativo gerado pela fração F4

4.3.2.1 Quantificação de H₂O₂ produzido por *S. sclerotiorum*

O O₂ reduzido durante o metabolismo celular em organismos aeróbicos pode causar a formação de ERO. Esses produtos, tais como H₂O₂ e O₂⁻ são gerados pelo próprio metabolismo, ou em condições ambientais adversas (YAO et al., 2006; GRATÃO et al., 2012). Este aumento de ERO pode causar estresse oxidativo na célula, alterando moléculas de DNA, RNA, proteínas e lipídios. Tais danos podem ser avaliados pela quantificação de H₂O₂ nas células, que é a principal causa de estresse oxidativo (CABISCOL et al., 2000).

S. sclerotiorum suportou a fração F4 nas concentrações de 0.098 à 0.78 µg/mL, caracterizando MIC na concentração de 1.56 µg/mL. Portanto as concentrações que

apresentaram crescimento foram utilizadas na avaliação do estresse oxidativo fúngico.

A fração F4 causa um aumento significativo de H_2O_2 em *S. sclerotiorum*, a partir da concentração de 0.78 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.0433$ – Anexo A, Sessão 12.6.1), no qual há um comprometimento nas taxas de crescimento do fungo (Fig. 8).

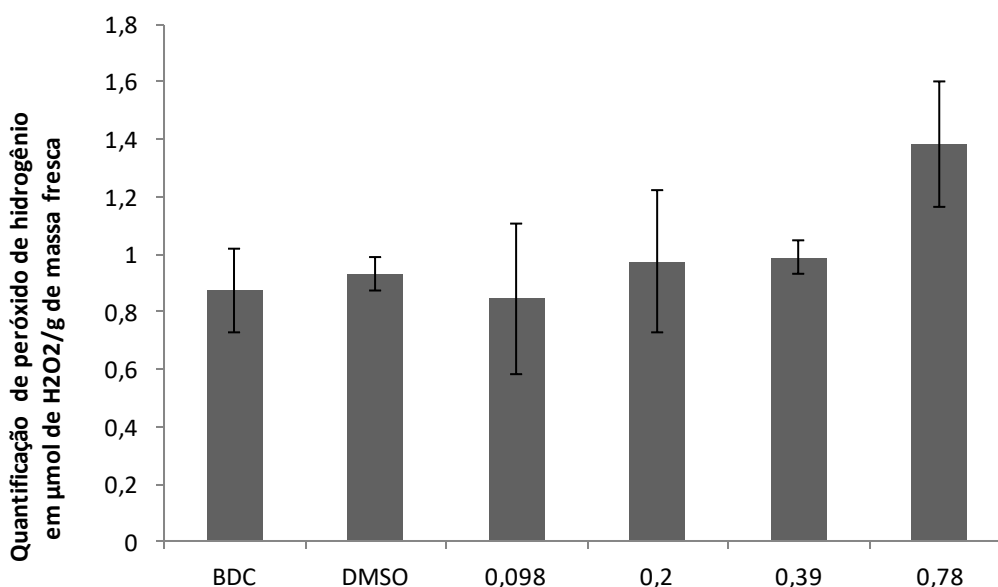


Figura 8 – Determinação dos níveis médios de H_2O_2 em *S. sclerotiorum* na presença da fração F4 nos tratamentos **BDC**: controle utilizando apenas meio BDC; **DMSO**: controle utilizando 0,5% de DMSO homogeneizado em BDC; **0,098**; **0,20**; **0,39** e **0,78**: concentrações em $\mu\text{g/mL}$ da fração F4 diluídas em 0,5% de DMSO e homogeneizadas em BDC. As linhas verticais representam a barra de erro padrão.

4.3.2.2 Produção de MDA pela reação com H_2O_2

MDA é um aldeído tóxico que é liberado quando o H_2O_2 reage com o ácido graxo insaturado da membrana, podendo causar danos celulares (HEALTH & PACKER, 1968), portanto a quantificação de MDA pode ser considerado como um indicador de estresse oxidativo.

Ocorre um aumento significativo na produção de MDA em *S. sclerotiorum* a partir da concentração de 0.78 $\mu\text{g/mL}$ da fração F4 ($p < 0.023$ – Anexo A, Sessão 13.6). Estes resultados são proporcionais aos obtidos para H_2O_2 , sugerindo que estes estejam produzindo a quebra dos ácidos graxos insaturados da membrana (Fig.9).

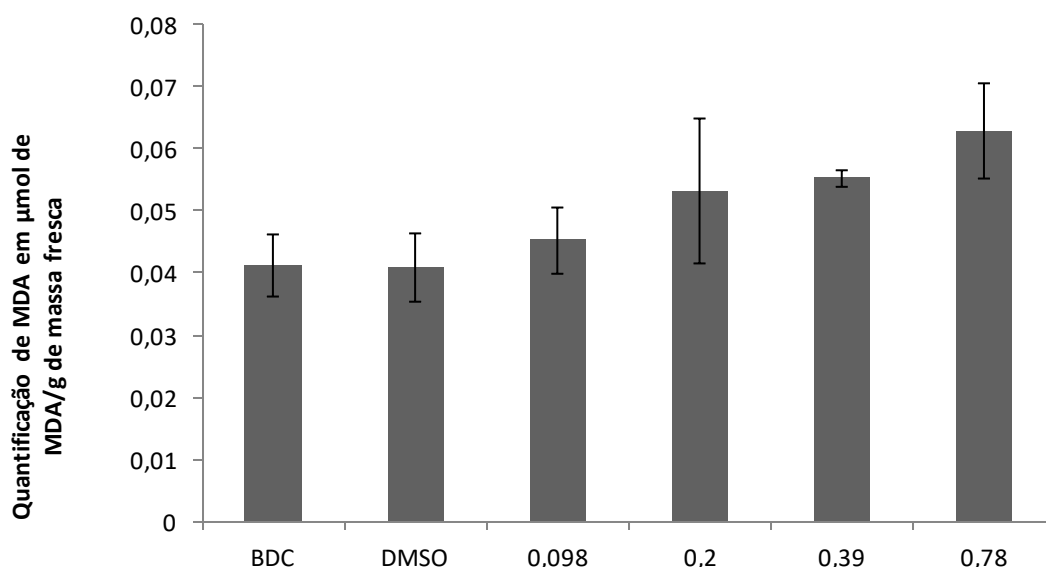


Figura 9 - Quantificação de MDA em *S. sclerotiorum* na presença da fração F4. **BDC**: controle utilizando apenas meio BDC; **DMSO**: controle utilizando 0,5% de DMSO homogeneizado em BDC; **0,098**; **0,20**; **0,39** e **0,78**: concentrações em μg/mL da fração F4 diluídas em 0,5% de DMSO e homogeneizadas em BDC. As linhas verticais representam a barra de erro padrão.

4.3.3 Avaliação do sistema antioxidativo de resposta de *S. sclerotiorum*

4.3.3.1 Atividade e isoformas de SOD na presença da fração F4

A maioria dos organismos quando expostos a elevadas concentrações de oxigênio apresentam danos celulares, que manifestam altas taxas de mutação, defeitos de crescimento e morte. Porém o O_2 não reage diretamente com a maioria das biomoléculas, mas por meio de formas reduzidas que se formam no interior da célula ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $OH^{\cdot}$). A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa contra as ERO, por ser responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$, que é a primeira espécie a ser formada pela redução do O_2 por um único elétron (RYAN et al., 2010).

S. sclerotiorum apresenta três isoenzimas de SOD, de acordo com os testes de inibição por KCN e H_2O_2 , representadas na Fig. 7: Mn-SOD I; Mn-SOD II e Fe-SOD (Fig. 10).

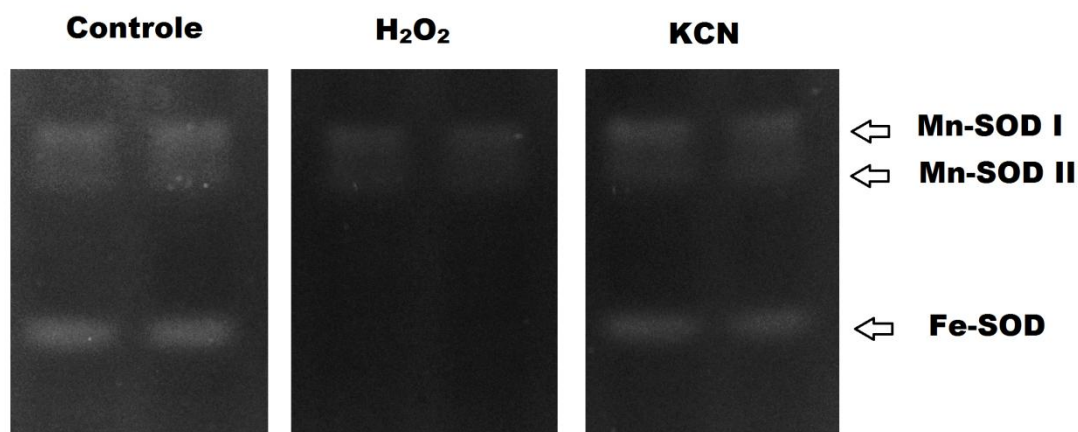


Figura 10 – PAGE não-desnaturante para determinação de isoformas de SOD em *S. sclerotiorum*. **Controle**: gel revelado para SOD sem tratamento com H_2O_2 e KCN; **H_2O_2** : gel revelado para SOD com tratamento com H_2O_2 ; **KCN**: gel revelado para SOD com tratamento com KCN.

Consideramos que não existem diferenças importantes nas atividades das duas isoenzimas Mn-SOD nos tratamentos e controle. Já a Fe-SOD demonstra a menor atividade no controle BDC. A partir do controle com DMSO até o tratamento com 0.20 $\mu\text{g/mL}$ da fração F4, há um aumento na atividade desta isoforma, indicando a especificidade da Fe-SOD na resposta a esta fração. Além disso, a diminuição da atividade a partir da concentração 0.20 até 0.78 $\mu\text{g/mL}$ indica uma perda da efetividade no sistema antioxidativo do fungo causada pela fração F4 (Fig. 11).

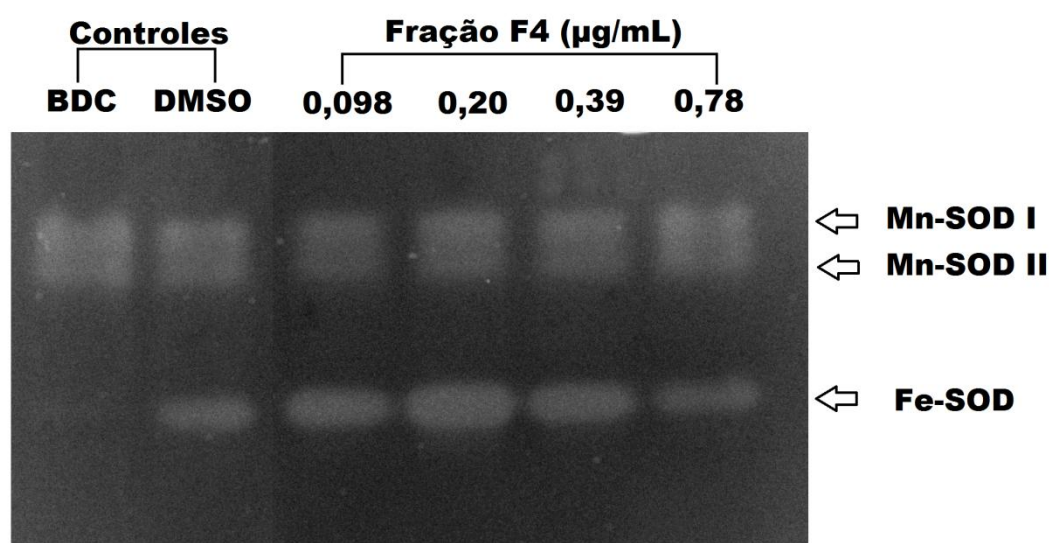


Figura 11 – Gel de SOD de *S. sclerotiorum*, quando esta foi incubada na presença da fração F4. **Controles**: BDC e DMSO; **Fração F4 ($\mu\text{g/mL}$)**: 0,098; 0,20; 0,39 e 0,78 em $\mu\text{g/mL}$ da fração F4

Mn-SOD é a primeira enzima de defesa contra normalmente encontrada no citoplasma e responde provavelmente ao aumento dos níveis do radical O_2^- ; já a Fe-SOD é considerada a mais importante para a proteção citoplasmática contra estresse oxidativo (GRUBBER et al., 1990).

4.3.3.2 Atividade de CAT

A dismutação do O_2^- , feita pela SOD, dá origem a espécie reativa H_2O_2 . A função mais importante da catalase (CAT) é impedir a formação do radical hidroxila, devido à ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o H_2O_2 . Ela converte moléculas de H_2O_2 em O_2 e H_2O (IMLAY, 2013).

O perfil de CAT determinado em nosso trabalho indica que *S. sclerotiorum* possui apenas uma isoforma, a qual apresentou menor atividade nos tratamentos com a fração F4 quando comparadas com os controles BDC e BDC+DMSO representados na Fig. 12. Como consequência, os níveis celulares de H_2O_2 foram mais altos na presença da fração F4 (Fig 8), caracterizando uma situação de estresse oxidativo, o qual pode ter levado a baixas taxas de crescimento e a inibição da germinação de escleródios.

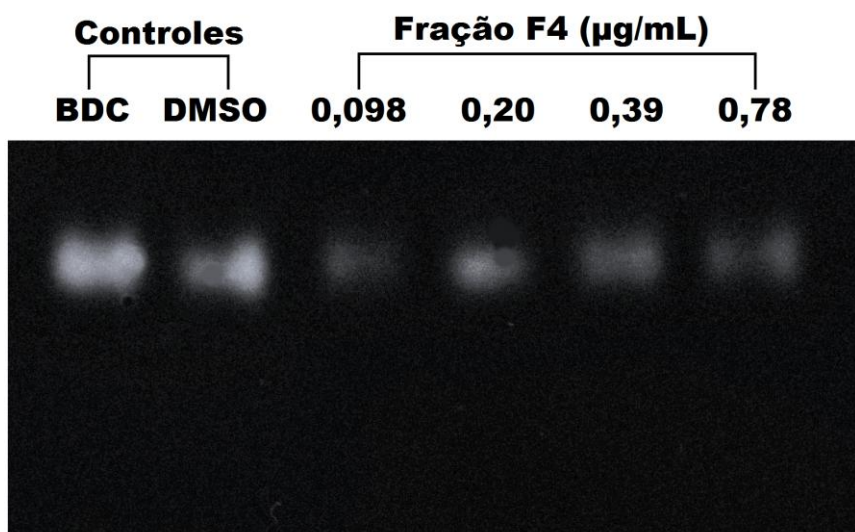


Figura 12 – Gel de CAT de *S. sclerotiorum* após incubação com fração F4. **Controles:** BDC e DMSO; **Fração F4 (µg/mL):** 0,098; 0,20; 0,39 e 0,78 em µg/mL da fração F4.

Grande parte dos micro-organismos possuem mais de uma isoforma de CAT, como os fungos *Fusarium solani*, com 4 isoformas (HALL, 1967), *Fusarium proliferatum*, com 5 (KWON e ANDERSON, 2001A), *Phanerochaete chrysosporium*

com 4 (KWON e ANDERSON, 2001B), *Metarhizium anisopliae* com 2 (MILLER et al., 2004). Evolutivamente, organismos com diferentes isoformas podem se adaptar com maior facilidade a condições de estresse. Uma única enzima pode não ser suficiente para a proteção de micro-organismos contra os danos de ERO, devido à necessidade de múltiplas formas de compartimentação, especificidade de substrato, requisitos de metal, estabilidade e demanda de elétrons (MISHRA e IMLAY, 2012).

4.4 CONCLUSÕES

S. sclerotiorum possui três isoenzimas de SOD, duas Mn-SOD e uma Fe-SOD. As duas primeiras não apresentaram alterações importantes na atividade enzimática. Já a Fe-SOD apresentou um aumento na atividade em presença de DMSO e da fração F4, indicando a especificidade desta isoforma. Consequentemente, houve aumento nos níveis de H₂O₂ celulares e na peroxidação lipídica.

Entretanto, não houve aumentos na atividade da única isoforma de CAT de *S. sclerotiorum*, esperado para minimizar os danos causados por H₂O₂, sobrecarregando o sistema antioxidativo de defesa do fitopatógeno. Assim, o estresse oxidativo gerado pela fração F4 possivelmente afetou a capacidade de crescimento e de germinação de escleródios em *S. sclerotiorum*, apresentando potencial de utilização em controle biológico deste fitopatógeno.

4.5 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G. (2008). Process of production and obtantion of substances with antibiotic activity to control diseases caused by bacteria in plants. BR Patent nº P10803350-1A. **Brazil Patent Application**. Available at: www.inpi.gov.br
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 16, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**. v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Internatl Microbiol**. v. 3, p. 3-8, 2000.

CARDOZO, V. F.; OLIVEIRA, A. G.; NISHIO, E. K.; PERUGINI, M. R. E.; ANDRADE, C. G. T. J.; SILVEIRA, W. D.; DURAN, N.; ANDRADE, G.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 12, n. 12, p. 1-8, 2013.

DESHWAL, V. K. *Pseudomonas aeruginosa* as biological control agent against plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **IJPAES**. v. 2, n. 1, p. 14-17, 2012.

DOURADO, M. N.; MARTINS, P. F.; QUECINE, M. C.; PIOTTO, F. A.; SOUZA, L. A.; FRANCO, M. R.; TEZOTTO, T.; AZEVEDO, R. A. Burkholderia sp. SCMS54 reduces cadmium toxicity and promotes growth in tomato. **Annals of Applied Biology**. v. 163, p. 494-507, 2013.

FERGUSON, G. P.; Protective mechanisms against toxic electrophiles in Escherichia coli. **Trends Microbiol**. v. 7, n. 6, p. 242-247, 1999.

FERNANDO, W. G. D.; NAKKEERAN, S.; ZHANG, Y.; SAVCHUK, S. Biological of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. **Crop Protection**. v. 26, p. 100-107, 2007.

GÓIS, C. G. M.; LOPES-SANTOS, L.; BERNGER, J. P. O.; OLIVEIRA, A. G.; SPAGO, F. R.; ANDRADE, G. The controle of *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation processo of fuel ethanol industry in Brazil. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**. v. 3, p. 194-201, 2013.

GONG, Q.; ZHANG, C.; LU, F.; ZHAO, H.; BIE, X.; LU, Z. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbj and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. **Food Control**. v. 36, p. 8-14, 2014.

GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD FILHO, D. S.; PILEGGI, M.; HENNEBERG, L.; PIERRE, M. L. C.; VRISMAN, C. M.; DABUL, A. N. G. Rapid PCR-based assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detection on soybean seeds. **Scientia Agricola**. v. 72, n. 1, p. 69-74, 2015.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. R.; Biochemical dissection of diageotropia and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 56, p. 79-96, 2012.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; TEZOTTO, T.; CARVALHO, R. F.; ALVES, L. R.; PETERS, L. P.; AZEVEDO, R. A. Cadmium estress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **Biometals**. v. 28, n. 5, p. 803-816, 2015.

GRUBBER, M. Y.; GLICK, B. R.; THOMPSON, J. E. Cloned manganese superoxide dismutase reduces oxidative stress in *Escherichia coli* and *Anacystis nidulans*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 87, p. 2608-2612, 1990.

GUPTA, C. P.; KUMAR, B.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Chitinase-mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. **BioControl**. v. 51, p. 821-835, 2006.

HALL, R. Proteins and Catalase isoenzymes from *Fusarium solani* and their taxonomic significance. **Aust. J. Biol. Sci.** v. 20, p. 419-428, 1967.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 125, n. 1, p 189-198, 1968.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**. v. 11, p. 443-454, 2013.

JI, J.; YANG, J.; HUANG, L.; KANG, Z. A novel antifungal peptide purified from *Bacillus subtilis* strain EDR₄. **Arch Biol Sci**. v. 68, n. 2, p. 319-324, 2016.

KABBAGE, M.; YARDEN, O.; DICKMAN, M. B. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: Switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant Science**. v. 233, p. 53-60, 2015.

KWON, S. I.; ANDERSON, A. J. Catalase activities of *Phanerochaete chrysosporium* are not coordinately produced with ligninolytic metabolism: catalases from a white-rot fungus. **Current Microbiology**. v. 42, p. 8-11, 2001B.

KWON, S. I.; ANDERSON, A. J. Differential production of superoxide dismutase and Catalase isozymes during infection of wheat by a *Fusarium proliferatum*-like fungal isolate. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 58, p. 73-81, 2001A.

LI, G. Q.; HUANG, H. C.; MIAO, H. J.; ERICKSON, R. S.; JIANG, D. H.; XIAO, Y. N. Biological control of *Sclerotinia* diseases of rapeseed by aerial applications of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **Eur. J. Plant Pathol**. v. 114, p. 345-355, 2006.

LOPES, L. P.; OLIVEIRA, A. G.; BERANGER, J. P. O.; GÓIS, C. G.; VASCONCELLOS, F. C. S.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. **Tropical Plant Pathology**. v. 37, n. 4, p. 233-238, 2012 .

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**. v. 63, p. 541-556, 2009.

MILLER, C. D.; RANGEL, D.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S.; KWON, S. I.; MESSIAS, C. L.; ROBERTS, D. W.; ANDERSON, A. J. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelia growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. **Can. J. Microbiol**. v. 50, p. 41-49, 2004.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Arch. Biochem. Biophys.** v. 525, n. 2, p. 145-160, 2012.

MURATE, L. S.; OLIVEIRA, A. G.; HIGASHI, A. Y.; BARAZETTI, A. R.; SIMIONATO, A. S.; SILVA, C. S.; SIMÕES, G. C.; SANTOS, I. M. O.; FERREIRA, M. R.; CELY, M. V. T.; NAVARRO, M. O. P.; FREITAS, V. F.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, J. C. P.; LEITE, R. P.; ANDRADE, G. Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. **Agricultural Sciences**. v. 6, p. 295-303, 2015.

OLCHANHESKI, L. R.; DOURADO, M. N.; BELTRAME, F. L.; ZIELINSKI, A. A. F.; DEMIATE, I. M.; PILEGGI, S. A. V.; AZEVEDO, R. A.; SADOWSKY, M. J.; PILEGGI, M. Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5- α . **Plos One**. v. 9, n. 6, p. 1-8, 2014.

OLIVEIRA, A. G.; MURATE, L. S.; SPAGO, F. R.; LOPES, L. P.; BERANGER, J. P. O.; MARTIN, J. A. B. S.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, C. G. T. J.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**. v. 56, p. 125-131, 2011.

OLIVEIRA, A. G.; SPAGO, F. R.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; SILVA, C. S.; BARAZETTI, A. R.; CELY, M. V. T.; TISCHER, C. A.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; NOVELLO, C. R.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the Growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. 113. p. 1-12, 2016.

ONARAN, A.; YANAR, Y. Screening bacterial species for antagonistic activities against the *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary causal agent of cucumber white mold disease. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 12, p. 2223- 2229, 2011.

PETERS, L. P.; CARVALHO, G.; MARTINS, P. F.; DOURADO, M. N.; VILHENA, M. B.; PILEGGI, M.; AZEVEDO, R. A. Differential responses of the antioxidant system of ametryn and clomazone tolerant bacteria. **Plos One**. v. 9, n. 11, p. 1-12, 2014.

RAMPAZO, L. G. L. (2004). Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. **Master thesis**, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

REIS, E. M.; CASA, R. T. Patologia de cereais de inverno. **Aldeia Norte Editora**. p. 88, 1998.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SPAGO, F. R.; MAURO, C. S. I.; OLIVEIRA, A. G.; BERANGER, J. P. O.; CELY, M. V. T.; STANGANELLI, M. M.; SIMIONATO, A. S.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE G. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. **Crop Protection**. v. 62, p. 46-54, 2014.

THERESE, K. L.; BAGYALAKSHMI, R.; MADHAVAN. H. N.; DEEPA, P. *In-vitro* susceptibility testing by agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, fluconazole and ketoconazole against ocular fungal isolates. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 24, n. 4, p. 273-279, 2006.

VASCONCELLOS, F. C. S.; OLIVEIRA, A. G.; LOPES-SANTOS, L.; BERANGER, J. P. O.; CELY, M. V. T.; SIMIONATO, A. S.; PISTORI, J. F.; SPAGO, F. R.; MELLO, J. C. P.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; ANDRADE, G. Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomona aeruginosa* LV strai against *Xanthomonas arborícola* pv. *pruni*. **Agricultural Sciences**. v. 5, n. 1, p. 71-76, 2014.

VINALE, F.; MANGANIELLO, G.; NIGRO, M.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; LANZUISE, S.; VARLESE, R.; CAVALLO, P.; LORITO, M.; WOO, S. L. A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. **Molecules**. v. 19, p. 9760-9772, 2014.

WANG, N. N.; GAO, X. N.; YAN, X.; LI, Z. P.; KANG, Z. S.; HUANG, L. L.; HAN, Q. M. Purification, characterization, and heterologous expression of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain Em7 and its activity against

Sclerotinia sclerotiorum. **Genetics and Molecular Research**. v. 14, n. 4, p. 15488-15504, 2015.

WANG, N. N.; YAN, X.; GAO, X. N.; NIU, H. J.; KANG, Z. S.; HUANG, L. L. Purification and characterization of a potential antifungal protein from *Bacillus subtilis* E1R-J against *Valsa mali*. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 32, n. 63, p. 1-10, 2016.

YAO, X. H.; MIN, H.; LV, Z. M. Response of superoxide dismutase, Catalase and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. **Biomedical and Environmental Science**. v. 19, p. 309-314, 2006.

ZABLOTOWICZ, R. M.; HOAGLAND, R. E.; LOCKE, M. A.; HICKEY, W. J. Glutathione-S-Transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by Rhizosphere Bacteria. **Applies an Environmental Microbiology**. v. 61, n. 3, p. 1054-1060, 1995.

ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X.; LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 100, p. 64-74, 2016.

ZIVKOVIC, S.; STOJANOVIC, S.; IVANOVIC, Z.; GAVRILOVIC, V.; POPOVIC, T.; BALAZ, J. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Arch. Biol. Sci**. v. 62, n. 3, p. 611-623, 2010.

5. REFERÊNCIAS GERAIS

- AHMED, A. S.; EZZIYYANI, C.; SÁNCHEZ, C. P.; CANDELA, M. E. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. And *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annum*) plants. **European Journal of Plant Pathology**. v. 109, p. 633-637, 2003.
- ANDRADE, G. (2008). Process of production and obtention of substances with antibiotic activity to control diseases caused by bacteria in plants. BR Patent nº P10803350-1A. **Brazil Patent Application**. Available at: www.inpi.gov.br
- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a Catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**. v. 104, p. 280-292, 1998.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; MASCIO, P. D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**. v. 29, p. 1340-1344, 2006.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org). Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**. v. 12, n. 12, p 123-130, 1999.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 16, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**. v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

CABISCOL. E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Internatl Microbiol.** v. 3, p. 3-8, 2000.

CARDOZO, V. F.; OLIVEIRA, A. G.; NISHIO, E. K.; PERUGINI, M. R. E.; ANDRADE, C. G. T. J.; SILVEIRA, W. D.; DURAN, N.; ANDRADE, G.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.** v. 12, n. 12, p. 1-8, 2013.

CLARKSON, P. M. THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr.** v. 72, n. 2, p. 637-646, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drugs leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

DESHWAL, V. K. *Pseudomonas aeruginosa* as biological control agent against plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **IJPAES.** v. 2, n. 1, p. 14-17, 2012.

DOURADO, M. N.; MARTINS, P. F.; QUECINE, M. C.; PIOTTO, F. A.; SOUZA, L. A.; FRANCO, M. R.; TEZOTTO, T.; AZEVEDO, R. A. Burkholderia sp. SCMS54 reduces cadmium toxicity and promotes growth in tomato. **Annals of Applied Biology.** v. 163, p. 494-507, 2013.

FERGUSON, G. P.; Protective mechanisms against toxic electrophiles in Escherichia coli. **Trends Microbiol.** v. 7, n. 6, p. 242-247, 1999.

FERNANDO, W. G. D.; NAKKEERAN, S.; ZHANG, Y.; SAVCHUK, S. Biological of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. **Crop Protection.** v. 26, p. 100-107, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB.** v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review Biochemistry.** v. 64, p. 97-112, 1995.

GHELFI, A.; GAZIOLA, S. A.; CIA, M. C.; CHABREGAS, S. M.; FALCO, M. C.; KUSER-FALCÃO, P. R.; AZEVEDO, R. A. Cloning, expression, molecular modelling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. **Annals of Applied Biology**. v. 159, n. 2, p. 267-280, 2011.

GÓIS, C. G. M.; LOPES-SANTOS, L.; BERNGER, J. P. O.; OLIVEIRA, A. G.; SPAGO, F. R.; ANDRADE, G. The controle f *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation processo f fuel ethanol industry in Brazil. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**. v. 3, p. 194-201, 2013.

GONG, Q.; ZHANG, C.; LU, F.; ZHAO, H.; BIE, X.; LU, Z. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbj and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. **Food Control**. v. 36, p. 8-14, 2014.

GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD FILHO, D. S.; PILEGGI, M.; HENNEBERG, L.; PIERRE, M. L. C.; VRISMAN, C. M.; DABUL, A. N. G. Rapid PCR-based assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detection on soybean seeds. **Scientia Agricola**. v. 72, n. 1, p. 69-74, 2015.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. R.; Biochemical dissection of diageotropia and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 56, p. 79-96, 2012.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; TEZOTTO, T.; CARVALHO, R. F.; ALVES, L. R.; PETERS, L. P.; AZEVEDO, R. A. Cadmium estress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **Biomaterials**. v. 28, n. 5, p. 803-816, 2015.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. v. 32, p. 481-494, 2005.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**. v. 53, p. 110-118, 2004.

GRUBBER, M. Y.; GLICK, B. R.; THOMPSON, J. E. Cloned manganese superoxide dismutase reduces oxidative stress in *Escherichia coli* and *Anacystis nidulans*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 87, p. 2608-2612, 1990.

GUPTA, C. P.; KUMAR, B.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Chitinase-mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. **BioControl**. v. 51, p. 821-835, 2006.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**. 2005.

HALL, R. Proteins and Catalase isoenzymes from *Fusarium solani* and their taxonomic significance. **Aust. J. Biol. Sci.** v. 20, p. 419-428, 1967.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford**. 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.**; v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**. v. 11, p. 443-454, 2013.

JI, J.; YANG, J.; HUANG, L.; KANG, Z. A novel antifungal peptide purified from *Bacillus subtilis* strain EDR₄. **Arch Biol Sci**. v. 68, n. 2, p. 319-324, 2016.

KABBAGE, M.; YARDEN, O.; DICKMAN, M. B. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: Switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant Science**. v. 233, p. 53-60, 2015.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.**; v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

KWON, S. I.; ANDERSON, A. J. Catalase activities of *Phanerochaete chrysosporium* are not coordinately produced with ligninolytic metabolism: catalases from a white-rot fungus. **Current Microbiology**. v. 42, p. 8-11, 2001B.

KWON, S. I.; ANDERSON, A. J. Differential production of superoxide dismutase and Catalase isozymes during infection of wheat by a *Fusarium proliferatum*-like fungal isolate. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 58, p. 73-81, 2001A.

LI, G. Q.; HUANG, H. C.; MIAO, H. J.; ERICKSON, R. S.; JIANG, D. H.; XIAO, Y. N. Biological control os *Sclerotinia* diseases of rapeseed by aerial applications of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **Eur. J. Plant Pathol.** v. 114, p. 345-355, 2006.

LOPES, L. P.; OLIVEIRA, A. G.; BERANGER, J. P. O; GÓIS, C. G.; VASCONCELLOS, F. C. S.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. **Tropical Plant Pathology**. v. 37, n. 4, p. 233-238, 2012 .

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**. v. 63, p. 541-556, 2009.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia Industrial**. In: MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. 12^a edição. Porto Alegre: **Artmed**. p. 734-760, 2010.

MILLER, C. D.; RANGEL, D.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S.; KWON, S. I.; MESSIAS, C. L.; ROBERTS, D. W.; ANDERSON, A. J. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelia growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. **Can. J. Microbiol.** v. 50, p. 41-49, 2004.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Arch. Biochem. Biophys.** v. 525, n. 2, p. 145-160, 2012.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and estress combination. **Trends in Plant Science**. v.11, p. 15-18, 2006.

MORANDI, M. A. B.; PAULA, T. J.; BETTIOL, W.; TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**. v. 30, n. 251, p. 73-82, 2009.

MURATE, L. S.; OLIVEIRA, A. G.; HIGASHI, A. Y.; BARAZETTI, A. R.; SIMIONATO, A. S.; SILVA, C. S.; SIMÕES, G. C.; SANTOS, I. M. O.; FERREIRA, M. R.; CELY, M. V. T.; NAVARRO, M. O. P.; FREITAS, V. F.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, J. C. P.; LEITE, R. P.; ANDRADE, G. Activity of secondary sacterial metabolites in the control of citrus canker. **Agricultural Sciences**. v. 6, p. 295-303, 2015.

NARWAL, S. S. Potential and prospects of allelopathy mediated weed control for sustainable agriculture. In: NARWAL, S. S.; TAURO, P. (Ed.). Allelopathy in pests management for sustainable agriculture. **Jodhpur: Scientific Publishers**. p. 23-66, 1996.

OLCHANHESKI, L. R.; DOURADO, M. N.; BELTRAME, F. L.; ZIELINSKI, A. A. F.; DEMIATE, I. M.; PILEGGI, S. A. V.; AZEVEDO, R. A.; SADOWSKY, M. J.; PILEGGI, M. Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5- α . **Plos One**. v. 9, n. 6, p. 1-8, 2014.

OLIVEIRA, A. G.; MURATE, L. S.; SPAGO, F. R.; LOPES, L. P.; BERANGER, J. P. O.; MARTIN, J. A. B. S.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, C. G. T. J.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**. v. 56, p. 125-131, 2011.

OLIVEIRA, A. G.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; ANDRADE, G. **Antimicrobianos Naturais Produzidos por Microrganismos: da Busca à Identificação**. In: YAMADA-OGATTA, S. M.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; NOGUEIRA, M. A. Tópicos Especiais em Microbiologia. Londrina: UEL/Departamento de Microbiologia, 2015.

OLIVEIRA, A. G.; SPAGO, F. R.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; SILVA, C. S.; BARAZETTI, A. R.; CELY, M. V. T.; TISCHER, C. A.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; NOVELLO, C. R.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the Growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. 113. p. 1-12, 2016.

ONARAN, A.; YANAR, Y. Screening bacterial species for antagonistic activities against the *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary causal agent of cucumber white mol disease. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 12, p. 2223- 2229, 2011.

PAPAPOSTOULOU, I.; GEORGIU, C. D. Superoxide radical is involved in the sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi: identification of a fungal xanthine oxidase. *Fungal Biology*. v. 114, p. 387-395, 2010.

PETERS, L. P.; CARVALHO, G.; MARTINS, P. F.; DOURADO, M. N.; VILHENA, M. B.; PILEGGI, M.; AZEVEDO, R. A. Differential responses of the antioxidant system of ametryn and clomazone tolerant bacteria. **Plos One**. v. 9, n. 11, p. 1-12, 2014.

PIETERSE, C. M. J. et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 13, p. 277-295, 2005.

RAMPAZO, L. G. L. (2004). Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. **Master thesis**, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

REIS, E. M.; CASA, R. T. Patologia de cereais de inverno. **Aldeia Norte Editora**. p. 88, 1998.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*. v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**. v. 10, n. 10, p. 308-313, 2004.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.** v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. M. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Mecanismos e processos biológicos de solo: Perspectiva ambiental. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Centro Nacional de Pesquisa de Soja – Documentos**, 45, p. 142, 1994.

SPAGO, F. R.; MAURO, C. S. I.; OLIVEIRA, A. G.; BERANGER, J. P. O.; CELY, M. V. T.; STANGANELLI, M. M.; SIMIONATO, A. S.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. **Crop Protection.** v. 62, p. 46-54, 2014.

THERESE, K. L.; BAGYALAKSHMI, R.; MADHAVAN. H. N.; DEEPA, P. *In-vitro* susceptibility testing by agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, fluconazole and ketoconazole against ocular fungal isolates. **Indian Journal of Medical Microbiology.** v. 24, n. 4, p. 273-279, 2006.

TUZUN, S.; KLOEPPER, J. Practical application and implementation of induced resistance. In: KUC, J. (Ed.). Induced resistance to diseases in plants. **Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press**, p. 152-68, 1995.

VASCONCELLOS, F. C. S.; OLIVEIRA, A. G.; LOPES-SANTOS, L.; BERANGER, J. P. O.; CELY, M. V. T.; SIMIONATO, A. S.; PISTORI, J. F.; SPAGO, F. R.; MELLO, J. C. P.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; ANDRADE, G. Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomona aeruginosa* LV strai against *Xanthomonas arborícola* pv. *pruni*. **Agricultural Sciences.** v. 5, n. 1, p. 71-76, 2014.

VINALE, F.; MANGANIELLO, G.; NIGRO, M.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; LANZUISE, S.; VARLESE, R.; CAVALLO, P.; LORITO, M.; WOO, S. L. A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. **Molecules.** v. 19, p. 9760-9772, 2014.

VRISMAN, C. M.; HULLER, G. C.; SARTORI, F. F.; HENNEBERG, L.; WUTZKI, C. R.; JULIATTI, F. C.; JACCOUD FILHO, D. S. Influence of herbicides and fungicides in the carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Biosci. J. Uberlândia*. v. 30, n. 2, p. 477-483, 2014.

WANG, N. N.; GAO, X. N.; YAN, X.; LI, Z. P.; KANG, Z. S.; HUANG, L. L.; HAN, Q. M. Purification, characterization, and heterologous expression of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain Em7 and its activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Genetics and Molecular Research**. v. 14, n. 4, p. 15488-15504, 2015.

WANG, N. N.; YAN, X.; GAO, X. N.; NIU, H. J.; KANG, Z. S.; HUANG, L. L. Purification and characterization of a potential antifungal protein from *Bacillus subtilis* E1R-J against *Valsa mali*. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 32, n. 63, p. 1-10, 2016.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; EDEN, M. E. V.; Aust, S. D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic Biol Med**. v. 32, n. 7, p. 577-583, 2002.

XIE, T.; SONG, S.; LI, S.; OUYANG, L. XIA, L. HUANG, J. Review of natural product databases. **Cell Proliferation**, v. 48, p. 398-404, 2015.

YAO, X. H.; MIN, H.; LV, Z. M. Response of superoxide dismutase, Catalase and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. **Biomedical and Environmental Science**. v. 19, p. 309-314, 2006.

ZABLOTOWICZ, R. M.; HOAGLAND, R. E.; LOCKE, M. A.; HICKEY, W. J. Glutathione-S-Transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by Rhizosphere Bacteria. **Applies an Environmental Microbiology**. v. 61, n. 3, p. 1054-1060, 1995.

ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X.; LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 100, p. 64-74, 2016.

ZIVKOVIC, S.; STOJANOVIC, S.; IVANOVIC, Z.; GAVRILOVIC, V.; POPOVIC, T.; BALAZ, J. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Arch. Biol. Sci.** v. 62, n. 3, p. 611-623, 2010.

ANEXO A – Análises Estatísticas

Sessão 1 – Antagonismo Direto

Sessão 1.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

c= controle; t= tratamento

c3 codad, bonferroni means st

1 = c x 2 = t		Summary of C-3	
		Mean	Std. Dev.
1		62	7
2		45.666667	1.5275252
Total		53.833333	10.028293

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	400.166667	1	400.166667	15.59	0.0168
Within groups	102.666667	4	25.666667		
Total	502.833333	5	100.566667		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(1) = 2.8020$ Prob> $\chi^2 = 0.094$

Comparison of C-3 by 1 = c x 2 = t
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	1
2	-16.3333
	0.017

Sessão 1.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

c= controle; t= tratamento

C4 codad, bonferroni means st

1 = c x 2 = t		Summary of C-4	
		Mean	Std. Dev.
1		85	0
2		50	2
Total		67.5	19.211975

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	1837.50	1	1837.50	918.75	0.0000
Within groups	8.00	4	2.00		
Total	1845.50	5	369.10		

Comparison of C-4 by 1 = c x 2 = t
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	1
2	-35
	0.000

Sessão 1.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

c= controle; t= tratamento

c5 codad, bonferroni means st

1 = c x 2 = t		Summary of C-5	
		Mean	Std. Dev.
1		85	0
2		50.666667	2.081666
Total		67.833333	18.851171

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	1768.16667	1	1768.16667	816.08	0.0000
Within groups	8.66666667	4	2.16666667		
Total	1776.83333	5	355.366667		

Comparison of C-5 by 1 = c x 2 = t
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	1
2	-34.3333
	0.000

Sessão 1.4 – Análise de Bonferroni e Fisher no sexto dia de avaliação

c= controle; t= tratamento

c6 codad, bonferroni means st

1 = c x 2 = t		Summary of C-6	
		Mean	Std. Dev.
1		85	0
2		50	5.1961524
Total		67.5	19.449936

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	1837.50	1	1837.50	136.11	0.0003
Within groups	54.00	4	13.50		
Total	1891.50	5	378.30		

Comparison of C-6 by 1 = c x 2 = t
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	1
2	-35
	0.000

Sessão 1.5 – Análise de Bonferroni e Fisher no sétimo dia de avaliação

c= controle; t= tratamento

c7 codad, bonferroni means st

Summary of C-7		
1 = c x 2 = t	Mean	Std. Dev.
1	85	0
2	54.333333	1.1547005
Total	69.666667	16.812694

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	1410.66667	1	1410.66667	2116.00	0.0000
Within groups	2.6666667	4	.66666667		
Total	1413.33333	5	282.666667		

Comparison of C-7 by 1 = c x 2 = t
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	1
2	-30.6667
	0.000

.

Sessão 2 – Teste de Poço

Sessão 2.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

c= controle; t= tratamento

c3 codct, bonferroni means st

		Summary of C-3	
1=c x 2=t		Mean	Std. Dev.
1		21	1
2		10.333333	.57735027
Total		15.666667	5.8878406

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	170.666667	1	170.666667	256.00	0.0001
Within groups	2.66666667	4	.666666667		
Total	173.333333	5	34.6666667		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.4603 Prob>chi2 = 0.497

Comparison of C-3 by 1=c x 2=t
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean		1
2		-10.6667
		0.000

Sessão 2.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

c= controle; t= tratamento

c4 codct, bonferroni means st

		Summary of C-4	
1=c x 2=t		Mean	Std. Dev.
1		25	0
2		17.333333	.57735027
Total		21.166667	4.2150524

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	88.1666667	1	88.1666667	529.00	0.0000
Within groups	.66666667	4	.16666667		
Total	88.8333333	5	17.7666667		

Comparison of C-4 by 1=c x 2=t
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean		1
2		-7.66667
		0.000

Sessão 2.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

c= controle; t= tratamento

c5 codct, bonferroni means st

		Summary of C-5	
1=c x 2=t		Mean	Std. Dev.
1		25	0
2		25	0
Total		25	0

		Analysis of Variance			F	Prob > F
Source		SS	df	MS		
Between groups		0.00	1	0.00		
Within groups		0.00	4	0.00		
Total		0.00	5	0.00		

Comparison of C-5 by 1=c x 2=t
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean		1
2		0
		.

Sessão 3 – Teste de Disco com a Fração Bruta dos Metabólitos

Sessão 3.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

c3 codct, bonferroni means st

Summary of C-3			
	Mean	Std. Dev.	
1	21.333333	.57735027	
2	10.333333	2.3094011	
3	8.666667	.57735027	
4	3.666667	.57735027	
Total	11	6.8224229	

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	499.333333	3	166.444444	105.12	0.0000
Within groups	12.666667	8	1.58333333		
Total	512.00	11	46.5454545		

Bartlett's test for equal variances: chi2(3) = 5.7269 Prob>chi2 = 0.126

Comparison of C-3 by 1=c x 2=100 x 3=250 x 4=500
(Bonferroni)

Row Mean-	1	2	3
Col Mean			
2	-11		
	0.000		
3	-12.6667	-1.66667	
	0.000	0.860	
4	-17.6667	-6.66667	-5
	0.000	0.001	0.007

Sessão 3.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

c4 codct, bonferroni means st

Summary of C-4			
	Mean	Std. Dev.	
1	25	0	
2	19	4.3588989	
3	13	1.7320508	
4	6.3333333	1.1547005	
Total	15.833333	7.529739	

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	577.00	3	192.333333	32.97	0.0001
Within groups	46.6666667	8	5.83333333		
Total	623.666667	11	56.6969697		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 2.9832$ Prob> $\chi^2 = 0.225$

note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:
1 multiple-observation cells not used

Comparison of C-4 by 1=c x 2=100 x 3=250 x 4=500 (Bonferroni)				
Row Mean-	1	2	3	
Col Mean				
2	-6			
	0.096			
3	-12	-6		
	0.002	0.096		
4	-18.6667	-12.6667	-6.66667	
	0.000	0.001	0.058	

Sessão 3.2.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação do controle x 100 µg

c= controle; 100= 100 µg;

1= c; 2= 100

discc4_1x2 codc4_1x2, bonferroni means st

codc4_1x2	Summary of c4	
	Mean	Std. Dev.
1	25	0
2	19	4.3588989
Total	22	4.2895221

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	54.00	1	54.00	5.68	0.0756
Within groups	38.00	4	9.50		
Total	92.00	5	18.40		

Comparison of c4 by codc4_1x2
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	1
2	-6
	0.076

Sessão 3.2.2 – Análise de Kruskal-Wallis no quarto dia de avaliação do controle x 100 µg

C= controle; 100= 100 µg

1= c; 2= 100

codc4_1x2, by (codc4_1x2)

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

codc4_~2	_Obs	_RankSum
1	3	6.00
2	3	15.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.
probability = 0.0495

chi-squared with ties = 5.000 with 1 d.f.
probability = 0.0253

Sessão 3.2.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação de 100 µg x 250 µg

100= 100 µg; 250= 250 µg

discc4_2x3 codc4_2x3, bonferroni means st

2=100 x		Summary of c4	
3=250		Mean	Std. Dev.
-----+-----			
2		19	4.3588989
3		13	1.7320508
-----+-----			
Total		16	4.4271887

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	54.00	1	54.00	4.91	0.0911
Within groups	44.00	4	11.00		

Total	98.00	5	19.60		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 1.2044 Prob>chi2 = 0.272

Comparison of c4 by 2=100 x 3=250
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean		2
-----+-----		
3		-6
		0.091

Sessão 3.2.4 – Análise de Kruskal-Wallis no quarto dia de avaliação de 100 µg x 250 µg

100= 100 µg; 250 µg

2= 100; 3= 250.

```
. kwallis discc4_2x3, by ( codc4_2x3)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

codc4_~3	_Obs	_RankSum
2	3	14.00
3	3	7.00

chi-squared = 2.333 with 1 d.f.
probability = 0.1266

chi-squared with ties = 2.634 with 1 d.f.
probability = 0.1046

Sessão 3.2.5 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação de 250 µg x 500 µg

250= 250 µg; 500= 500 µg

3= 250; 4= 500

discc4_3x4 codc4_3x4, bonferroni means st

3=250 x		Summary of c4	
4=500		Mean	Std. Dev.
-----+-----			
3		13	1.7320508
4		6.3333333	1.1547005
-----+-----			
Total		9.6666667	3.8815804

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	66.6666667	1	66.6666667	30.77	0.0052
Within groups	8.6666667	4	2.1666667		

Total	75.3333333	5	15.0666667		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.2561 Prob>chi2 = 0.613

Comparison of c4 by 3=250 x 4=500
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean		3
-----+-----		
4		-6.66667
		0.005

Sessão 3.2.6 – Análise de Kruskal-Wallis no quarto dia de avaliação de 250 µg x 500 µg

250= 250 µg; 500= 500 µg

3= 250; 4= 500

```
discc4_3x4, by ( codc4_3x4)
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
```

codc4_~4	_Obs	_RankSum
3	3	15.00
4	3	6.00

```
chi-squared =      3.857 with 1 d.f.
probability =      0.0495
```

```
chi-squared with ties =      4.091 with 1 d.f.
probability =      0.0431
```

Sessão 3.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

c5 codct, bonferroni means st

Summary of C-5			
	Mean	Std. Dev.	
1	25	0	
2	25	0	
3	19.333333	1.1547005	
4	9.333333	.57735027	
Total	19.666667	6.7059449	

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	491.333333	3	163.777778	393.07	0.0000
Within groups	3.333333	8	.416666667		
Total	494.666667	11	44.969697		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(1) = 0.7141$ Prob> $\chi^2 = 0.398$

note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:
2 multiple-observation cells not used

Comparison of C-5 by 1=c x 2=100 x 3=250 x 4=500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	1	2	3
2	0		
	1.000		
3	-5.66667	-5.66667	
	0.000	0.000	
4	-15.6667	-15.6667	-10
	0.000	0.000	0.000

Sessão 3.4 – Análise de Bonferroni e Fisher no sexto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

c6 codct, bonferroni means st

1=c x 2=100	Summary of C-6	
x 3=250 x	Mean	Std. Dev.
4=500		
-----+-----		
1	25	0
2	25	0
3	25	0
4	17	1.7320508
-----+-----		
Total	23	3.6927447

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	144.00	3	48.00	64.00	0.0000
Within groups	6.00	8	.75		
-----+-----					
Total	150.00	11	13.6363636		

Comparison of C-6 by 1=c x 2=100 x 3=250 x 4=500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	1	2	3
-----+-----			
2	0		
	1.000		
3	0	0	
	1.000	1.000	
4	-8	-8	-8
	0.000	0.000	0.000

Sessão 4 – Teste de Disco com a Fração F3

Sessão 4.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f3_t3 conc, bonferroni means st

Summary of médias		
	Mean	Std. Dev.
0=contr x	25	0
100 x 250 x	18.666667	.57735027
500	15.666667	2.3094011
-----+-----	17	1.7320508
Total	19.083333	3.9418116

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	153.583333	3	51.1944444	23.63	0.0002
Within groups	17.3333333	8	2.16666667		

Total	170.916667	11	15.5378788		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 2.4687 Prob>chi2 = 0.291

Comparison of médias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-	0	100	250
Col Mean			
-----+-----			
100	-6.33333		
	0.005		
250	-9.33333	-3	
	0.000	0.223	
500	-8	-1.66667	1.33333
	0.001	1.000	1.000

Sessão 4.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f3_t4 conc, bonferroni means st

0=contr x	Summary of medias	
100 x 250 x		
500	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
0	25	0
100	25	0
250	22	3
500	25	0
-----+-----		
Total	24.25	1.8647447

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	20.25	3	6.75	3.00	0.0951
Within groups	18.00	8	2.25		
-----+-----					
Total	38.25	11	3.47727273		

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250
-----+-----			
100	0		
	1.000		
250	-3	-3	
	0.240	0.240	
500	0	0	3
	1.000	1.000	0.240

Sessão 5 – Teste de Disco com a Fração F4

Sessão 5.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no segundo dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f4_t2 conc, bonferroni means st

Summary of medias			
	Mean	Std. Dev.	
0=contr x			
100 x 250 x			
500			
-----+-----			
0	6.6666667	.57735027	
100	1.6666667	.57735027	
250	2	1	
500	.33333333	.57735027	
-----+-----			
Total	2.6666667	2.5702258	

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	68.6666667	3	22.8888889	45.78	0.0000
Within groups	4.00	8	.50		
-----+-----					
Total	72.6666667	11	6.60606061		

Bartlett's test for equal variances: chi2(3) = 0.8661 Prob>chi2 = 0.834

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250
-----+-----			
100	-5		
	0.000		
250	-4.66667	.333333	
	0.000	1.000	
500	-6.33333	-1.33333	-1.66667
	0.000	0.298	0.122

Sessão 5.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f4_t3 conc, bonferroni means st

0=contr x	Summary of medias	
100 x 250 x		
500	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
0	25	0
100	3	0
250	3	1
500	2	0
-----+-----		
Total	8.25	10.118615

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	1124.25	3	374.75	1499.00	0.0000
Within groups	2.00	8	.25		
-----+-----					
Total	1126.25	11	102.386364		

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250
-----+-----			
100	-22		
	0.000		
250	-22	0	
	0.000	1.000	
500	-23	-1	-1
	0.000	0.240	0.240

Sessão 5.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f4_t4 conc, bonferroni means st

0=contr x		Summary of medias	
100 x 250 x		Mean	Std. Dev.
500			
-----+-----			
0		25	0
100		9	2
250		3.6666667	.57735027
500		2.6666667	.57735027
-----+-----			
Total		10.083333	9.3852722

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	959.583333	3	319.861111	274.17	0.0000
Within groups	9.33333333	8	1.16666667		

Total	968.916667	11	88.0833333		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 3.4960 Prob>chi2 = 0.174

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250

100	-16		
	0.000		
250	-21.3333	-5.33333	
	0.000	0.002	
500	-22.3333	-6.33333	-1
	0.000	0.001	1.000

Sessão 5.4 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f4_t5 conc, bonferroni means st

Summary of medias		
	Mean	Std. Dev.
0=contr x		
100 x 250 x		
500		
-----+-----		
0	25	0
100	16.333333	3.7859389
250	6	1.7320508
500	3	0
-----+-----		
Total	12.583333	9.268307

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	910.25	3	303.416667	70.02	0.0000
Within groups	34.6666667	8	4.33333333		
Total	944.916667	11	85.9015152		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.8924 Prob>chi2 = 0.345

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-	0	100	250
Col Mean			
-----+-----			
100	-8.66667		
	0.006		
250	-19	-10.3333	
	0.000	0.002	
500	-22	-13.3333	-3
	0.000	0.000	0.693

Sessão 5.5 – Análise de Bonferroni e Fisher no sexto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f4_t6 conc, bonferroni means st

0=contr x	Summary of medias	
100 x 250 x	Mean	Std. Dev.
500		
-----+-----		
0	25	0
100	16	7.8102497
250	10.333333	2.081666
500	3	0
-----+-----		
Total	13.583333	9.0800314

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	776.25	3	258.75	15.84	0.0010
Within groups	130.666667	8	16.3333333		
Total	906.916667	11	82.4469697		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 2.2328 Prob>chi2 = 0.135

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250
-----+-----			
100	-9		
	0.156		
250	-14.6667	-5.66667	
	0.013	0.746	
500	-22	-13	-7.33333
	0.001	0.026	0.342

Sessão 6 – Teste de Disco com a Fração F5

Sessão 6.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f5_t3 conc, bonferroni means st

0=contr x		Summary of medias	
100 x 250 x		Mean	Std. Dev.
500			
-----+-----			
0		25	0
100		5.6666667	.57735027
250		5.3333333	.57735027
500		5.3333333	.57735027
-----+-----			
Total		10.333333	8.8557463

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
-----+-----					
Between groups	860.666667	3	286.888889	1147.56	0.0000
Within groups	2.00	8	.25		
-----+-----					
Total	862.666667	11	78.4242424		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.0000 Prob>chi2 = 1.000

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250
-----+-----			
100	-19.3333		
	0.000		
250	-19.6667	-.333333	
	0.000	1.000	
500	-19.6667	-.333333	0
	0.000	1.000	1.000

Sessão 6.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f5_t4 conc, bonferroni means st

0=contr x		Summary of medias	
100 x 250 x		Mean	Std. Dev.
500			
-----+-----			
0		25	0
100		6	0
250		8.6666667	2.8867513
500		6.3333333	.57735027
-----+-----			
Total		11.5	8.3066239

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	741.666667	3	247.222222	114.10	0.0000
Within groups	17.3333333	8	2.16666667		

Total	759.00	11	69.00		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 3.0576 Prob>chi2 = 0.080

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250

100	-19		
	0.000		
250	-16.3333	2.66667	
	0.000	0.344	
500	-18.6667	.333333	-2.33333
	0.000	1.000	0.529

Sessão 6.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f5_t5 conc, bonferroni means st

0=contr x	Summary of medias	
100 x 250 x		
500	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
0	25	0
100	17.333333	.57735027
250	14	0
500	6.333333	.57735027
-----+-----		
Total	15.666667	7.0108142

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	539.333333	3	179.777778	1078.67	0.0000
Within groups	1.3333333	8	.16666667		
-----+-----					
Total	540.666667	11	49.151515		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.0000 Prob>chi2 = 1.000

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250
-----+-----			
100	-7.66667		
	0.000		
250	-11	-3.33333	
	0.000	0.000	
500	-18.6667	-11	-7.66667
	0.000	0.000	0.000

Sessão 6.4 – Análise de Bonferroni e Fisher no sexto dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

f5_t6 conc, bonferroni means st

0=contr x	Summary of medias	
100 x 250 x		
500	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
0	25	0
100	25	0
250	19.666667	.57735027
500	6.3333333	.57735027
-----+-----		
Total	19	7.9772404

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	698.666667	3	232.888889	1397.33	0.0000
Within groups	1.33333333	8	.166666667		

Total	700.00	11	63.6363636		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.0000 Prob>chi2 = 1.000

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250
-----+-----			
100	0		
	1.000		
250	-5.33333	-5.33333	
	0.000	0.000	
500	-18.6667	-18.6667	-13.3333
	0.000	0.000	0.000

Sessão 6.5 – Análise de Bonferroni e Fisher no sétimo dia de avaliação

c= controle; 100= 100 µg; 250= 250 µg; 500= 500 µg

.f5_t7 conc, bonferroni means st

0=contr x	Summary of medias	
100 x 250 x		
500	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
0	25	0
100	25	0
250	25	0
500	6.3333333	.57735027
-----+-----		
Total	20.333333	8.4459063

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	784.00	3	261.333333	3136.00	0.0000
Within groups	.666666667	8	.083333333		

Total	784.666667	11	71.3333333		

Comparison of medias by 0=contr x 100 x 250 x 500
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	100	250
-----+-----			
100	0		
	1.000		
250	0	0	
	1.000	1.000	
500	-18.6667	-18.6667	-18.6667
	0.000	0.000	0.000

Sessão 7 – Comparação dos resultados dos testes de disco entre as frações F3, F4 e F5 com 100 µg

Sessão 7.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no segundo dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t2_100 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+		-----	
0		6.6666667	.57735027
3		7	0
4		1.6666667	.57735027
5		5	0
-----+		-----	
Total		5.0833333	2.2343733

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	53.5833333	3	17.8611111	107.17	0.0000
Within groups	1.3333333	8	.166666667		

Total	54.9166667	11	4.99242424		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.0000 Prob>chi2 = 1.000

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5 (Bonferroni)				
Row Mean-	Col Mean	0	3	4
-----+				
3		.333333		
		1.000		
4		-5	-5.33333	
		0.000	0.000	
5		-1.66667	-2	3.33333
		0.006	0.002	0.000

Sessão 7.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t3_100 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		18.666667	.57735027
4		3	0
5		5.6666667	.57735027
-----+-----			
Total		13.083333	9.491224

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	989.583333	3	329.861111	1979.17	0.0000
Within groups	1.33333333	8	.166666667		

Total	990.916667	11	90.0833333		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.0000 Prob>chi2 = 1.000

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	3	4

3	-6.33333		
	0.000		
4	-22	-15.6667	
	0.000	0.000	
5	-19.3333	-13	2.66667
	0.000	0.000	0.000

Sessão 7.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t4_100 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		9	2
5		6	0
-----+-----			
Total		16.25	9.245392

Source	Analysis of Variance				
	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	932.25	3	310.75	310.75	0.0000
Within groups	8.00	8	1.00		

Total	940.25	11	85.4772727		

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean	0	3	4
-----+-----				
3		0		
		1.000		
4		-16	-16	
		0.000	0.000	
5		-19	-19	-3
		0.000	0.000	0.038

Sessão 7.4 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t5_100 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		16.333333	3.7859389
5		17.333333	.57735027
-----+-----			
Total		20.916667	4.581749

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	201.583333	3	67.1944444	18.33	0.0006
Within groups	29.3333333	8	3.66666667		

Total	230.916667	11	20.9924242		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 3.8734 Prob>chi2 = 0.049

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5 (Bonferroni)				
Row Mean-				
Col Mean	0	3	4	

3	0			
	1.000			
4	-8.66667	-8.66667		
	0.003	0.003		
5	-7.66667	-7.66667	1	
	0.007	0.007	1.000	

Sessão 7.5 – Análise de Bonferroni e Fisher no sexto dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t6_100 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		16	7.8102497
5		25	0
-----+-----			
Total		22.75	5.2591911

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	182.25	3	60.75	3.98	0.0524
Within groups	122.00	8	15.25		

Total	304.25	11	27.6590909		

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean	0	3	4
-----+-----				
3		0		
		1.000		
4		-9	-9	
		0.134	0.134	
5		0	0	9
		1.000	1.000	0.134

Sessão 7.6 – Análise de Bonferroni e Fisher no sétimo dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t7_100 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		25	0
5		25	0
-----+-----			
Total		25	0

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	0.00	3	0.00		
Within groups	0.00	8	0.00		

Total	0.00	11	0.00		

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean			
		0	3	4
-----+-----				
3		0		
		.		
4		0	0	
		.	.	
5		0	0	0
		.	.	.

Sessão 8 – Comparação dos resultados dos testes de disco entre as frações F3, F4 e F5 com 250 µg

Sessão 8.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no segundo dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t2_250 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+		-----	
0		6.6666667	.57735027
3		7	0
4		2	1
5		5.3333333	.57735027
-----+		-----	
Total		5.25	2.1373305

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	46.9166667	3	15.6388889	37.53	0.0000
Within groups	3.33333333	8	.416666667		

Total	50.25	11	4.56818182		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.7100 Prob>chi2 = 0.701

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5 (Bonferroni)				
Row Mean-	Col Mean	0	3	4
-----+				
3		.333333		
		1.000		
4		-4.66667	-5	
		0.000	0.000	
5		-1.33333	-1.66667	3.33333
		0.212	0.080	0.001

Sessão 8.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t3_250 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		15.666667	2.3094011
4		3	1
5		5.3333333	.57735027
-----+-----			
Total		12.25	9.2257052

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	922.916667	3	307.638889	184.58	0.0000
Within groups	13.3333333	8	1.66666667		

Total	936.25	11	85.1136364		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 2.9784 Prob>chi2 = 0.226

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5 (Bonferroni)				
Row Mean-				
Col Mean	0	3	4	

3	-9.33333			
	0.000			
4	-22	-12.6667		
	0.000	0.000		
5	-19.6667	-10.3333	2.33333	
	0.000	0.000	0.347	

Sessão 8.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t4_250 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		22	3
4		3.6666667	.57735027
5		8.6666667	2.8867513
-----+-----			
Total		14.833333	9.4756466

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	952.333333	3	317.444444	71.87	0.0000
Within groups	35.3333333	8	4.41666667		

Total	987.666667	11	89.7878788		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 3.4369 Prob>chi2 = 0.179

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5 (Bonferroni)					
Row Mean-					
Col Mean	0	3	4		

3	-3				
	0.711				
4	-21.3333	-18.3333			
	0.000	0.000			
5	-16.3333	-13.3333	5		
	0.000	0.000	0.117		

Sessão 8.4 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t5_250 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		6	1.7320508
5		14	0
-----+-----			
Total		17.5	8.4045442

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	771.00	3	257.00	342.67	0.0000
Within groups	6.00	8	.75		

Total	777.00	11	70.6363636		

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean	0	3	4
-----+-----				
3		0		
		1.000		
4		-19	-19	
		0.000	0.000	
5		-11	-11	8
		0.000	0.000	0.000

Sessão 8.5 – Análise de Bonferroni e Fisher no sexto dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t6_250 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		10.333333	2.081666
5		19.666667	.57735027
-----+-----			
Total		20	6.3245553

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	430.666667	3	143.555556	123.05	0.0000
Within groups	9.33333333	8	1.16666667		

Total	440.00	11	40.00		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 2.1230 Prob>chi2 = 0.145

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5 (Bonferroni)				
Row Mean-				
Col Mean	0	3	4	

3	0			
	1.000			
4	-14.6667	-14.6667		
	0.000	0.000		
5	-5.33333	-5.33333	9.33333	
	0.002	0.002	0.000	

Sessão 8.6 – Análise de Bonferroni e Fisher no sétimo dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t7_250 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		10.333333	2.081666
5		25	0
-----+-----			
Total		21.333333	6.6923747

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	484.00	3	161.333333	148.92	0.0000
Within groups	8.66666667	8	1.08333333		

Total	492.666667	11	44.7878788		

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean			
		0	3	4

3		0		
		1.000		
4		-14.6667	-14.6667	
		0.000	0.000	
5		0	0	14.6667
		1.000	1.000	0.000

Sessão 9 – Comparação dos resultados dos testes de disco entre as frações F3, F4 e F5 com 500 µg

Sessão 9.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no segundo dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t2_500 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+		-----	
0		6.6666667	.57735027
3		7	0
4		.33333333	.57735027
5		5.3333333	.57735027
-----+		-----	
Total		4.8333333	2.8230652

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	85.6666667	3	28.5555556	114.22	0.0000
Within groups	2.00	8	.25		

Total	87.6666667	11	7.96969697		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.0000 Prob>chi2 = 1.000

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5 (Bonferroni)					
Row Mean-	Col Mean	0	3	4	
-----+					
3		.333333			
		1.000			
4		-6.33333	-6.66667		
		0.000	0.000		
5		-1.33333	-1.66667	5	
		0.069	0.021	0.000	

Sessão 9.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t3_500 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		17	1.7320508
4		2	0
5		5.3333333	.57735027
-----+-----			
Total		12.333333	9.6326465

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	1014.00	3	338.00	405.60	0.0000
Within groups	6.66666667	8	.833333333		

Total	1020.66667	11	92.7878788		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 1.6346 Prob>chi2 = 0.201

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5 (Bonferroni)				
Row Mean-	0	3	4	
Col Mean	-----			
3	-8			
	0.000			
4	-23	-15		
	0.000	0.000		
5	-19.6667	-11.6667	3.33333	
	0.000	0.000	0.012	

Sessão 9.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t4_500 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		2.6666667	.57735027
5		6.3333333	.57735027
-----+-----			
Total		14.75	10.796675

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	1280.91667	3	426.972222	2561.83	0.0000
Within groups	1.33333333	8	.166666667		

Total	1282.25	11	116.568182		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.0000 Prob>chi2 = 1.000

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5 (Bonferroni)				
Row Mean-				
Col Mean	0	3	4	
-----+-----				
3	0			
	1.000			
4	-22.3333	-22.3333		
	0.000	0.000		
5	-18.6667	-18.6667	3.66667	
	0.000	0.000	0.000	

Sessão 9.4 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t5_500 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		3	0
5		6.3333333	.57735027
-----+-----			
Total		14.833333	10.692677

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	1257.00	3	419.00	5028.00	0.0000
Within groups	.666666667	8	.083333333		

Total	1257.66667	11	114.333333		

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean			
		0	3	4
-----+-----				
3		0		
		1.000		
4		-22	-22	
		0.000	0.000	
5		-18.6667	-18.6667	3.33333
		0.000	0.000	0.000

Sessão 9.5 – Análise de Bonferroni e Fisher no sexto dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t6_500 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		3	0
5		6.3333333	.57735027
-----+-----			
Total		14.833333	10.692677

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	1257.00	3	419.00	5028.00	0.0000
Within groups	.666666667	8	.083333333		

Total	1257.66667	11	114.333333		

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean			
		0	3	4
-----+-----				
3		0		
		1.000		
4		-22	-22	
		0.000	0.000	
5		-18.6667	-18.6667	3.33333
		0.000	0.000	0.000

Sessão 9.6 – Análise de Bonferroni e Fisher no sétimo dia de avaliação

0= controle; 3= fração F3; 4= Fração F4; 5= fração F5

t7_500 fracoes, bonferroni means st

o=contr		Summary of medias	
3=fr3 4=fr4	5=fr5	Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		25	0
3		25	0
4		3	0
5		6.3333333	.57735027
-----+-----			
Total		14.833333	10.692677

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F

Between groups	1257.00	3	419.00	5028.00	0.0000
Within groups	.666666667	8	.083333333		

Total	1257.66667	11	114.333333		

Comparison of medias by o=contr 3=fr3 4=fr4 5=fr5
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean	0	3	4
-----+-----				
3		0		
		1.000		
4		-22	-22	
		0.000	0.000	
5		-18.6667	-18.6667	3.33333
		0.000	0.000	0.000

Sessão 10 – Concentração Inibitória Mínima com hifas de *S. sclerotiorum* utilizando fração F4

Sessão 10.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no primeiro dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

```
crescl trat, bonferroni means st
```

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	21	0
.02	20.333333	.57735027
.098	20	0
.2	20	0
.39	19.666667	.57735027
.78	19	0
1.56	17.333333	1.1547005
3.13	16	0
6.25	12.333333	.57735027
12.5	11	0
25	9.666667	.57735027
50	9	0
100	9	0
Total	15.717949	4.6788928

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	826.564103	12	68.8803419	335.79	0.0000
Within groups	5.33333333	26	.205128205		
Total	831.897436	38	21.8920378		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(4) = 1.6062$ Prob> $\chi^2 = 0.808$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)							
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78	
.02	-.666667 1.000						
.098	-1 0.929	-.333333 1.000					
.2	-1 0.929	-.333333 1.000	0 1.000				
.39	-1.33333 0.101	-.666667 1.000	-.333333 1.000	-.333333 1.000			
.78	-2 0.001	-1.33333 0.101	-1 0.929	-1 0.929	-.666667 1.000		
1.56	-3.66667 0.000	-3 0.000	-2.66667 0.000	-2.66667 0.000	-2.33333 0.000	-1.66667 0.010	
3.13	-5 0.000	-4.33333 0.000	-4 0.000	-4 0.000	-3.66667 0.000	-3 0.000	
6.25	-8.66667 0.000	-8 0.000	-7.66667 0.000	-7.66667 0.000	-7.33333 0.000	-6.66667 0.000	
12.5	-10 0.000	-9.33333 0.000	-9 0.000	-9 0.000	-8.66667 0.000	-8 0.000	
25	-11.3333 0.000	-10.6667 0.000	-10.3333 0.000	-10.3333 0.000	-10 0.000	-9.33333 0.000	
50	-12 0.000	-11.3333 0.000	-11 0.000	-11 0.000	-10.6667 0.000	-10 0.000	
100	-12 0.000	-11.3333 0.000	-11 0.000	-11 0.000	-10.6667 0.000	-10 0.000	
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
3.13	-1.33333 0.101						
6.25	-5 0.000	-3.66667 0.000					
12.5	-6.33333 0.000	-5 0.000	-1.33333 0.101				
25	-7.66667 0.000	-6.33333 0.000	-2.66667 0.000	-1.33333 0.101			
50	-8.33333 0.000	-7 0.000	-3.33333 0.000	-2 0.001	-.666667 1.000		
100	-8.33333 0.000	-7 0.000	-3.33333 0.000	-2 0.001	-.666667 1.000	0 1.000	

Sessão 10.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no segundo dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cresc2 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	72	2
.02	67.333333	1.5275252
.098	62.333333	2.5166115
.2	62	2.6457513
.39	19.666667	.57735027
.78	57.333333	1.5275252
1.56	52.333333	3.5118846
3.13	45	1
6.25	27.333333	.57735027
12.5	14	0
25	11.333333	2.5166115
50	9	0
100	9	0
Total	39.128205	23.913418

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	21645.6923	12	1803.80769	553.93	0.0000
Within groups	84.6666667	26	3.25641026		
Total	21730.359	38	571.851552		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 9.1206 Prob>chi2 = 0.426

Comparison of medias by tratamiento
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78
.02	-4.66667 0.305					
.098	-9.66667 0.000	-5 0.173				
.2	-10 0.000	-5.33333 0.097	-.333333 1.000			
.39	-52.3333 0.000	-47.6667 0.000	-42.6667 0.000	-42.3333 0.000		
.78	-14.6667 0.000	-10 0.000	-5 0.173	-4.66667 0.305	37.6667 0.000	
1.56	-19.6667 0.000	-15 0.000	-10 0.000	-9.66667 0.000	32.6667 0.000	-5 0.173
3.13	-27 0.000	-22.3333 0.000	-17.3333 0.000	-17 0.000	25.3333 0.000	-12.3333 0.000
6.25	-44.6667 0.000	-40 0.000	-35 0.000	-34.6667 0.000	7.66667 0.002	-30 0.000
12.5	-58 0.000	-53.3333 0.000	-48.3333 0.000	-48 0.000	-5.66667 0.054	-43.3333 0.000
25	-60.6667 0.000	-56 0.000	-51 0.000	-50.6667 0.000	-8.33333 0.000	-46 0.000
50	-63 0.000	-58.3333 0.000	-53.3333 0.000	-53 0.000	-10.6667 0.000	-48.3333 0.000
100	-63 0.000	-58.3333 0.000	-53.3333 0.000	-53 0.000	-10.6667 0.000	-48.3333 0.000
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50
3.13	-7.33333 0.003					
6.25	-25 0.000	-17.6667 0.000				
12.5	-38.3333 0.000	-31 0.000	-13.3333 0.000			
25	-41 0.000	-33.6667 0.000	-16 0.000	-2.66667 1.000		
50	-43.3333 0.000	-36 0.000	-18.3333 0.000	-5 0.173	-2.33333 1.000	
100	-43.3333 0.000	-36 0.000	-18.3333 0.000	-5 0.173	-2.33333 1.000	0 1.000

Sessão 10.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cresc3 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	85	0
.02	85	0
.098	85	0
.2	83.666667	1.5275252
.39	56.666667	6.5064071
.78	82	2
1.56	80.666667	1.5275252
3.13	74	0
6.25	58.666667	.57735027
12.5	26.666667	.57735027
25	12	3
50	9	0
100	9	0
Total	57.487179	30.946364

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	36270.4103	12	3022.53419	647.69	0.0000
Within groups	121.333333	26	4.66666667		
Total	36391.7436	38	957.677463		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(6) = 13.9271$ Prob> $\chi^2 = 0.030$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)							
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78	
.02	0 1.000						
.098	0 1.000	0 1.000					
.2	-1.33333 1.000	-1.33333 1.000	-1.33333 1.000				
.39	-28.3333 0.000	-28.3333 0.000	-28.3333 0.000	-27 0.000			
.78	-3 1.000	-3 1.000	-3 1.000	-1.66667 1.000	25.3333 0.000		
1.56	-4.33333 1.000	-4.33333 1.000	-4.33333 1.000	-3 1.000	24 0.000	-1.33333 1.000	
3.13	-11 0.000	-11 0.000	-11 0.000	-9.66667 0.001	17.3333 0.000	-8 0.009	
6.25	-26.3333 0.000	-26.3333 0.000	-26.3333 0.000	-25 0.000	2 1.000	-23.3333 0.000	
12.5	-58.3333 0.000	-58.3333 0.000	-58.3333 0.000	-57 0.000	-30 0.000	-55.3333 0.000	
25	-73 0.000	-73 0.000	-73 0.000	-71.6667 0.000	-44.6667 0.000	-70 0.000	
50	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-74.6667 0.000	-47.6667 0.000	-73 0.000	
100	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-74.6667 0.000	-47.6667 0.000	-73 0.000	
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
3.13	-6.66667 0.065						
6.25	-22 0.000	-15.3333 0.000					
12.5	-54 0.000	-47.3333 0.000	-32 0.000				
25	-68.6667 0.000	-62 0.000	-46.6667 0.000	-14.6667 0.000			
50	-71.6667 0.000	-65 0.000	-49.6667 0.000	-17.6667 0.000	-3 1.000		
100	-71.6667 0.000	-65 0.000	-49.6667 0.000	-17.6667 0.000	-3 1.000	0 1.000	

Sessão 10.4 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cresc4 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	85	0
.02	85	0
.098	85	0
.2	85	0
.39	83.666667	1.1547005
.78	85	0
1.56	85	0
3.13	85	0
6.25	83	0
12.5	47	1
25	13	4
50	9	0
100	9	0
Total	64.589744	31.767012

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	38310.7692	12	3192.5641	2263.82	0.0000
Within groups	36.6666667	26	1.41025641		
Total	38347.4359	38	1009.14305		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 3.8783$ Prob> $\chi^2 = 0.144$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)						
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78
.02	0 1.000					
.098	0 1.000	0 1.000				
.2	0 1.000	0 1.000	0 1.000			
.39	-1.33333 1.000	-1.33333 1.000	-1.33333 1.000	-1.33333 1.000		
.78	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	1.33333 1.000	
1.56	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	1.33333 1.000	0 1.000
3.13	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	1.33333 1.000	0 1.000
6.25	-2 1.000	-2 1.000	-2 1.000	-2 1.000	-.666667 1.000	-2 1.000
12.5	-38 0.000	-38 0.000	-38 0.000	-38 0.000	-36.6667 0.000	-38 0.000
25	-72 0.000	-72 0.000	-72 0.000	-72 0.000	-70.6667 0.000	-72 0.000
50	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-74.6667 0.000	-76 0.000
100	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-74.6667 0.000	-76 0.000
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50
3.13	0 1.000					
6.25	-2 1.000	-2 1.000				
12.5	-38 0.000	-38 0.000	-36 0.000			
25	-72 0.000	-72 0.000	-70 0.000	-34 0.000		
50	-76 0.000	-76 0.000	-74 0.000	-38 0.000	-4 0.026	
100	-76 0.000	-76 0.000	-74 0.000	-38 0.000	-4 0.026	0 1.000

Sessão 10.5 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cresc5 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	85	0
.02	85	0
.098	85	0
.2	85	0
.39	85	0
.78	85	0
1.56	85	0
3.13	85	0
6.25	85	0
12.5	76	1
25	17	8
50	9	0
100	9	0
Total	67.384615	31.119139

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	36669.2308	12	3055.76923	611.15	0.0000
Within groups	130.00	26	5.00		
Total	36799.2308	38	968.40081		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(1) = 4.4858$ Prob> $\chi^2 = 0.034$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)							
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78	
.02	0 1.000						
.098	0 1.000	0 1.000					
.2	0 1.000	0 1.000	0 1.000				
.39	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000			
.78	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000		
1.56	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
3.13	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
6.25	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
12.5	-9 0.003	-9 0.003	-9 0.003	-9 0.003	-9 0.003	-9 0.003	
25	-68 0.000	-68 0.000	-68 0.000	-68 0.000	-68 0.000	-68 0.000	
50	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	
100	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
3.13	0 1.000						
6.25	0 1.000	0 1.000					
12.5	-9 0.003	-9 0.003	-9 0.003				
25	-68 0.000	-68 0.000	-68 0.000	-59 0.000			
50	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-67 0.000	-8 0.013		
100	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-67 0.000	-8 0.013	0 1.000	

Sessão 10.6 – Análise de Bonferroni e Fisher no sexto dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cresc6 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	85	0
.02	85	0
.098	85	0
.2	85	0
.39	85	0
.78	85	0
1.56	85	0
3.13	85	0
6.25	85	0
12.5	85	0
25	44	6
50	9	0
100	9	0
Total	70.153846	28.642569

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	31103.0769	12	2591.92308	935.97	0.0000
Within groups	72.00	26	2.76923077		
Total	31175.0769	38	820.396761		

		Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)					
Row Mean- Col Mean		.01	.02	.098	.2	.39	.78
.02		0 1.000					
.098		0 1.000	0 1.000				
.2		0 1.000	0 1.000	0 1.000			
.39		0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000		
.78		0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
1.56		0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000
3.13		0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000
6.25		0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000
12.5		0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000
25		-41 0.000	-41 0.000	-41 0.000	-41 0.000	-41 0.000	-41 0.000
50		-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000
100		-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000
Row Mean- Col Mean		1.56	3.13	6.25	12.5	25	50
3.13		0 1.000					
6.25		0 1.000	0 1.000				
12.5		0 1.000	0 1.000	0 1.000			
25		-41 0.000	-41 0.000	-41 0.000	-41 0.000		
50		-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-35 0.000	
100		-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-35 0.000	0 1.000

Sessão 10.7 – Análise de Bonferroni e Fisher no sétimo dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cresc7 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	85	0
.02	85	0
.098	85	0
.2	85	0
.39	85	0
.78	85	0
1.56	85	0
3.13	85	0
6.25	85	0
12.5	85	0
25	66	4
50	9	0
100	9	0
Total	71.846154	27.636302

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	28991.0769	12	2415.92308	1962.94	0.0000
Within groups	32.00	26	1.23076923		
Total	29023.0769	38	763.765182		

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)						
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78
.02	0 1.000					
.098	0 1.000	0 1.000				
.2	0 1.000	0 1.000	0 1.000			
.39	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000		
.78	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
1.56	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000
3.13	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000
6.25	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000
12.5	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000
25	-19 0.000	-19 0.000	-19 0.000	-19 0.000	-19 0.000	-19 0.000
50	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000
100	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50
3.13	0 1.000					
6.25	0 1.000	0 1.000				
12.5	0 1.000	0 1.000	0 1.000			
25	-19 0.000	-19 0.000	-19 0.000	-19 0.000		
50	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-57 0.000	
100	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-76 0.000	-57 0.000	0 1.000

Sessão 11 – Concentração Inibitória Mínima com escleródios de *S. sclerotiorum* utilizando fração F4

Sessão 11.1 – Análise de Bonferroni e Fisher no primeiro dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

```
cres1 trat, bonferroni means st
```

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	18	1
.02	16	1
.098	14	2.6457513
.2	13.333333	3.0550505
.39	12.666667	3.0550505
.78	10.666667	1.5275252
1.56	8.6666667	.57735027
3.13	3	0
6.25	3	0
12.5	3.6666667	.57735027
25	3.6666667	.57735027
50	3	0
100	3.6666667	.57735027
Total	8.7179487	5.6426418

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	1147.23077	12	95.6025641	39.66	0.0000
Within groups	62.6666667	26	2.41025641		
Total	1209.89744	38	31.8394062		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(9) = 14.4592$ Prob> $\chi^2 = 0.107$

		Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)					
Row Mean-	Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78
.02		-2 1.000					
.098		-4 0.314	-2 1.000				
.2		-4.66667 0.083	-2.66667 1.000	-.666667 1.000			
.39		-5.33333 0.021	-3.33333 1.000	-1.33333 1.000	-.666667 1.000		
.78		-7.33333 0.000	-5.33333 0.021	-3.33333 1.000	-2.66667 1.000	-2 1.000	
1.56		-9.33333 0.000	-7.33333 0.000	-5.33333 0.021	-4.66667 0.083	-4 0.314	-2 1.000
3.13		-15 0.000	-13 0.000	-11 0.000	-10.3333 0.000	-9.66667 0.000	-7.66667 0.000
6.25		-15 0.000	-13 0.000	-11 0.000	-10.3333 0.000	-9.66667 0.000	-7.66667 0.000
12.5		-14.3333 0.000	-12.3333 0.000	-10.3333 0.000	-9.66667 0.000	-9 0.000	-7 0.001
25		-14.3333 0.000	-12.3333 0.000	-10.3333 0.000	-9.66667 0.000	-9 0.000	-7 0.001
50		-15 0.000	-13 0.000	-11 0.000	-10.3333 0.000	-9.66667 0.000	-7.66667 0.000
100		-14.3333 0.000	-12.3333 0.000	-10.3333 0.000	-9.66667 0.000	-9 0.000	-7 0.001
Row Mean-	Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50
3.13		-5.66667 0.011					
6.25		-5.66667 0.011	0 1.000				
12.5		-5 0.042	.666667 1.000	.666667 1.000			
25		-5 0.042	.666667 1.000	.666667 1.000	0 1.000		
50		-5.66667 0.011	0 1.000	0 1.000	-.666667 1.000	-.666667 1.000	
100		-5 0.042	.666667 1.000	.666667 1.000	0 1.000	0 1.000	.666667 1.000

Sessão 11.2 – Análise de Bonferroni e Fisher no segundo dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cres2 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	49.666667	6.8068593
.02	34	1
.098	31.333333	5.5075705
.2	30.333333	5.6862407
.39	30	4.5825757
.78	27.666667	2.5166115
1.56	23	0
3.13	9.6666667	1.5275252
6.25	3.3333333	.57735027
12.5	4	0
25	3.6666667	.57735027
50	3	0
100	3.6666667	.57735027
Total	19.487179	15.473019

Source	Analysis of Variance				
	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	8816.41026	12	734.700855	67.90	0.0000
Within groups	281.333333	26	10.8205128		
Total	9097.74359	38	239.414305		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(9) = 22.4317$ Prob> $\chi^2 = 0.008$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)							
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78	
.02	-15.6667 0.000						
.098	-18.3333 0.000	-2.66667 1.000					
.2	-19.3333 0.000	-3.66667 1.000	-1 1.000				
.39	-19.6667 0.000	-4 1.000	-1.33333 1.000	-.333333 1.000			
.78	-22 0.000	-6.33333 1.000	-3.66667 1.000	-2.66667 1.000	-2.33333 1.000		
1.56	-26.6667 0.000	-11 0.028	-8.33333 0.357	-7.33333 0.874	-7 1.000	-4.66667 1.000	
3.13	-40 0.000	-24.3333 0.000	-21.6667 0.000	-20.6667 0.000	-20.3333 0.000	-18 0.000	
6.25	-46.3333 0.000	-30.6667 0.000	-28 0.000	-27 0.000	-26.6667 0.000	-24.3333 0.000	
12.5	-45.6667 0.000	-30 0.000	-27.3333 0.000	-26.3333 0.000	-26 0.000	-23.6667 0.000	
25	-46 0.000	-30.3333 0.000	-27.6667 0.000	-26.6667 0.000	-26.3333 0.000	-24 0.000	
50	-46.6667 0.000	-31 0.000	-28.3333 0.000	-27.3333 0.000	-27 0.000	-24.6667 0.000	
100	-46 0.000	-30.3333 0.000	-27.6667 0.000	-26.6667 0.000	-26.3333 0.000	-24 0.000	
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
3.13	-13.3333 0.003						
6.25	-19.6667 0.000	-6.33333 1.000					
12.5	-19 0.000	-5.66667 1.000	.666667 1.000				
25	-19.3333 0.000	-6 1.000	.333333 1.000	-.333333 1.000			
50	-20 0.000	-6.66667 1.000	-.333333 1.000	-1 1.000	-.666667 1.000		
100	-19.3333 0.000	-6 1.000	.333333 1.000	-.333333 1.000	0 1.000	.666667 1.000	

Sessão 11.3 – Análise de Bonferroni e Fisher no terceiro dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cres3 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	79	2.6457513
.02	68.666667	2.081666
.098	66	1
.2	63.666667	3.2145503
.39	62	3.4641016
.78	59	3
1.56	55	4
3.13	43.666667	2.5166115
6.25	7	1
12.5	4	0
25	3.6666667	.57735027
50	3	0
100	3.6666667	.57735027
Total	39.871795	29.604569

Source	Analysis of Variance				
	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	33169.0256	12	2764.08547	531.03	0.0000
Within groups	135.333333	26	5.20512821		
Total	33304.359	38	876.430499		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(10) = 12.0708$ Prob> $\chi^2 = 0.280$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)							
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78	
.02	-10.3333 0.001						
.098	-13 0.000	-2.66667 1.000					
.2	-15.3333 0.000	-5 0.974	-2.33333 1.000				
.39	-17 0.000	-6.66667 0.108	-4 1.000	-1.66667 1.000			
.78	-20 0.000	-9.66667 0.002	-7 0.068	-4.66667 1.000	-3 1.000		
1.56	-24 0.000	-13.6667 0.000	-11 0.000	-8.66667 0.007	-7 0.068	-4 1.000	
3.13	-35.3333 0.000	-25 0.000	-22.3333 0.000	-20 0.000	-18.3333 0.000	-15.3333 0.000	
6.25	-72 0.000	-61.6667 0.000	-59 0.000	-56.6667 0.000	-55 0.000	-52 0.000	
12.5	-75 0.000	-64.6667 0.000	-62 0.000	-59.6667 0.000	-58 0.000	-55 0.000	
25	-75.3333 0.000	-65 0.000	-62.3333 0.000	-60 0.000	-58.3333 0.000	-55.3333 0.000	
50	-76 0.000	-65.6667 0.000	-63 0.000	-60.6667 0.000	-59 0.000	-56 0.000	
100	-75.3333 0.000	-65 0.000	-62.3333 0.000	-60 0.000	-58.3333 0.000	-55.3333 0.000	
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
3.13	-11.3333 0.000						
6.25	-48 0.000	-36.6667 0.000					
12.5	-51 0.000	-39.6667 0.000	-3 1.000				
25	-51.3333 0.000	-40 0.000	-3.33333 1.000	-.333333 1.000			
50	-52 0.000	-40.6667 0.000	-4 1.000	-1 1.000	-.666667 1.000		
100	-51.3333 0.000	-40 0.000	-3.33333 1.000	-.333333 1.000	0 1.000	.666667 1.000	

Sessão 11.4 – Análise de Bonferroni e Fisher no quarto dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cres4 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	85	0
.02	85	0
.098	85	0
.2	85	0
.39	85	0
.78	85	0
1.56	83	1.7320508
3.13	81	1.7320508
6.25	32.333333	1.5275252
12.5	4	0
25	3.6666667	.57735027
50	3	0
100	3.6666667	.57735027
Total	55.435897	37.647111

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	53839.5897	12	4486.63248	6480.69	0.0000
Within groups	18.00	26	.692307692		
Total	53857.5897	38	1417.30499		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(4) = 3.4861$ Prob> $\chi^2 = 0.480$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)							
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78	
.02	0 1.000						
.098	0 1.000	0 1.000					
.2	0 1.000	0 1.000	0 1.000				
.39	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000			
.78	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000		
1.56	-2 0.526	-2 0.526	-2 0.526	-2 0.526	-2 0.526	-2 0.526	
3.13	-4 0.000	-4 0.000	-4 0.000	-4 0.000	-4 0.000	-4 0.000	
6.25	-52.6667 0.000	-52.6667 0.000	-52.6667 0.000	-52.6667 0.000	-52.6667 0.000	-52.6667 0.000	
12.5	-81 0.000	-81 0.000	-81 0.000	-81 0.000	-81 0.000	-81 0.000	
25	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	
50	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	
100	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
3.13	-2 0.526						
6.25	-50.6667 0.000	-48.6667 0.000					
12.5	-79 0.000	-77 0.000	-28.3333 0.000				
25	-79.3333 0.000	-77.3333 0.000	-28.6667 0.000	-.333333 1.000			
50	-80 0.000	-78 0.000	-29.3333 0.000	-1 1.000	-.666667 1.000		
100	-79.3333 0.000	-77.3333 0.000	-28.6667 0.000	-.333333 1.000	0 1.000	.666667 1.000	

Sessão 11.5 – Análise de Bonferroni e Fisher no quinto dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cres5 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	85	0
.02	85	0
.098	85	0
.2	85	0
.39	85	0
.78	85	0
1.56	85	0
3.13	85	0
6.25	59.333333	2.5166115
12.5	10	2
25	3.6666667	.57735027
50	3	0
100	3.6666667	.57735027
Total	58.435897	36.712105

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	51193.5897	12	4266.13248	5041.79	0.0000
Within groups	22.00	26	.846153846		
Total	51215.5897	38	1347.77868		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(3) = 4.9846$ Prob> $\chi^2 = 0.173$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)							
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78	
.02	0 1.000						
.098	0 1.000	0 1.000					
.2	0 1.000	0 1.000	0 1.000				
.39	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000			
.78	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000		
1.56	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
3.13	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
6.25	-25.6667 0.000	-25.6667 0.000	-25.6667 0.000	-25.6667 0.000	-25.6667 0.000	-25.6667 0.000	
12.5	-75 0.000	-75 0.000	-75 0.000	-75 0.000	-75 0.000	-75 0.000	
25	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	
50	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	
100	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
3.13	0 1.000						
6.25	-25.6667 0.000	-25.6667 0.000					
12.5	-75 0.000	-75 0.000	-49.3333 0.000				
25	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-55.6667 0.000	-6.33333 0.000			
50	-82 0.000	-82 0.000	-56.3333 0.000	-7 0.000	-.666667 1.000		
100	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-55.6667 0.000	-6.33333 0.000	0 1.000	.666667 1.000	

Sessão 11.6 – Análise de Bonferroni e Fisher no sexto dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cres6 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	85	0
.02	85	0
.098	85	0
.2	85	0
.39	85	0
.78	85	0
1.56	85	0
3.13	85	0
6.25	84	1.7320508
12.5	29.333333	3.5118846
25	3.6666667	.57735027
50	3	0
100	3.6666667	.57735027
Total	61.820513	35.62958

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	48207.7436	12	4017.31197	3264.07	0.0000
Within groups	32.00	26	1.23076923		
Total	48239.7436	38	1269.46694		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(3) = 6.8383$ Prob> $\chi^2 = 0.077$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)							
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78	
.02	0 1.000						
.098	0 1.000	0 1.000					
.2	0 1.000	0 1.000	0 1.000				
.39	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000			
.78	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000		
1.56	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
3.13	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
6.25	-1 1.000	-1 1.000	-1 1.000	-1 1.000	-1 1.000	-1 1.000	
12.5	-55.6667 0.000	-55.6667 0.000	-55.6667 0.000	-55.6667 0.000	-55.6667 0.000	-55.6667 0.000	
25	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	
50	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	
100	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
3.13	0 1.000						
6.25	-1 1.000	-1 1.000					
12.5	-55.6667 0.000	-55.6667 0.000	-54.6667 0.000				
25	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-80.3333 0.000	-25.6667 0.000			
50	-82 0.000	-82 0.000	-81 0.000	-26.3333 0.000	-.666667 1.000		
100	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-80.3333 0.000	-25.6667 0.000	0 1.000	.666667 1.000	

Sessão 11.7 – Análise de Bonferroni e Fisher no sétimo dia de avaliação

.01= controle BDA; .02= controle DMSO; .098= 0.98 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; .39= 0.39 µg/mL; .78= 0.78 µg/mL; 1.56= 1.56 µg/mL; 3.13= 3.13 µg/mL; 6.25= 6.25 µg/mL; 12.5= 12.5 µg/mL; 25= 25 µg/mL; 50= 50 µg/mL; 100= 100 µg/mL.

cres7 trat, bonferroni means st

tratamento	Summary of medias	
	Mean	Std. Dev.
.01	85	0
.02	85	0
.098	85	0
.2	85	0
.39	85	0
.78	85	0
1.56	85	0
3.13	85	0
6.25	85	0
12.5	54.333333	3.0550505
25	3.6666667	.57735027
50	3	0
100	3.6666667	.57735027
Total	63.820513	34.492464

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	45189.7436	12	3765.81197	4895.56	0.0000
Within groups	20.00	26	.769230769		
Total	45209.7436	38	1189.73009		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 5.8509$ Prob> $\chi^2 = 0.054$

Comparison of medias by tratamiento (Bonferroni)							
Row Mean- Col Mean	.01	.02	.098	.2	.39	.78	
.02	0 1.000						
.098	0 1.000	0 1.000					
.2	0 1.000	0 1.000	0 1.000				
.39	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000			
.78	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000		
1.56	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
3.13	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
6.25	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	0 1.000	
12.5	-30.6667 0.000	-30.6667 0.000	-30.6667 0.000	-30.6667 0.000	-30.6667 0.000	-30.6667 0.000	
25	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	
50	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	
100	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	
Row Mean- Col Mean	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
3.13	0 1.000						
6.25	0 1.000	0 1.000					
12.5	-30.6667 0.000	-30.6667 0.000	-30.6667 0.000				
25	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-50.6667 0.000			
50	-82 0.000	-82 0.000	-82 0.000	-51.3333 0.000	-.666667 1.000		
100	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-81.3333 0.000	-50.6667 0.000	0 1.000	.666667 1.000	

Sessão 12 – Quantificação de H₂O₂

Sessão 12.1 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando todos os tratamentos

1= BDC; 2= DMSO; 98= 0.098 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; 39= 0.39 µg/mL; 78= 0.78 µg/mL

per_6 coper_6, bonferroni means st

bdc=1x		
dms0=2 x	Summary of bdc=1 dms0=2	
0098 x 02x	0098 02 039 078	
039 x 078	Mean	Std. Dev.

.2	.97511801	.38137774
1	.87324001	.18409517
2	.931456	.28519897
39	.98967201	.52930693
78	1.38263	.37540671
98	.84413201	.32062873

Total	.99937467	.36845702

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.768761395	5	.153752279	1.18	0.3592
Within groups	2.35373178	18	.130762877		

Total	3.12249317	23	.135760573		

Bartlett's test for equal variances: chi2(5) = 2.9804 Prob>chi2 = 0.703

Comparison of bdc=1 dms0=2 0098 02 039 078
by bdc=1x dms0=2 x 0098 x 02x 039 x 078
(Bonferroni)

Row Mean-					
Col Mean	.2	1	2	39	78

1	-.101878				
	1.000				
2	-.043662	.058216			
	1.000	1.000			
39	.014554	.116432	.058216		
	1.000	1.000	1.000		
78	.407512	.50939	.451174	.392958	
	1.000	0.926	1.000	1.000	
98	-.130986	-.029108	-.087324	-.14554	-.538498
	1.000	1.000	1.000	1.000	0.743

Sessão 12.2 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando os tratamentos BDC, DMSO e 0.098 µg/mL

1= BDC; 2= DMSO; 98= 0.098 µg/mL

per_3_1 cod_3_1, bonferroni means st

bdc=1 x		
dms0=2 x	Summary of Médias_3	
0098	Mean	Std. Dev.
-----+		
1	.87324001	.18409517
2	.931456	.28519897
98	.84413201	.32062873
-----+		
Total	.88294267	.24678157

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.015815807	2	.007907904	0.11	0.8981
Within groups	.654096787	9	.072677421		

Total	.669912594	11	.060901145		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.7930 Prob>chi2 = 0.673

Comparison of Médias_3 by bdc=1 x dms0=2 x 0098
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	1	2
-----+		
2	.058216	
	1.000	
98	-.029108	-.087324
	1.000	1.000

Sessão 12.3 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando os tratamentos 0.20, 0.39 e 0.78 µg/mL

.2= 0.20 µg/mL; 39= 0.39 µg/mL; 78= 0.78 µg/mL

per_3_2 cod_3_2, bonferroni means st

02 x 039 x 078		Summary of medias	
		Mean	Std. Dev.
.2		.97511801	.38137774
39		.98967201	.52930693
78		1.38263	.37540671
Total		1.1158067	.43975476

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.427591747	2	.213795874	1.13	0.3643
Within groups	1.69963499	9	.188848333		
Total	2.12722674	11	.193384249		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.4164 Prob>chi2 = 0.812

Comparison of medias by 02 x 039 x 078
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean	.2	39
39		.014554	
		1.000	
78		.407512	.392958
		0.652	0.699

Sessão 12.4 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando os tratamentos BDC e 0.20 µg/mL

1= BDC; .2= 0.20 µg/mL

per_1x02 cod1x02, bonferroni means st

		Summary of medias	
		bdcx02	
bdc x 02		Mean	Std. Dev.
.2		.97511801	.38137774
1		.87324001	.18409517
Total		.92417901	.28253401

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.020758255	1	.020758255	0.23	0.6475
Within groups	.538020029	6	.089670005		
Total	.558778284	7	.079825469		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 1.2582 Prob>chi2 = 0.262

Comparison of medias bdcx02 by bdc x 02
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean		.2
1		-.101878
		0.647

Sessão 12.5 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando os tratamentos BDC e 0.39 µg/mL

1= BDC; 39= 0.39 µg/mL

per_1x39 cod_1x39, bonferroni means st

		Summary of per_1x39	
1 x 39		Mean	Std. Dev.
1		.87324001	.18409517
39		.98967201	.52930693
Total		.93145601	.3721143

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.027112819	1	.027112819	0.17	0.6922
Within groups	.942170559	6	.157028426		
Total	.969283378	7	.138469054		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 2.4540 Prob>chi2 = 0.117

Comparison of per_1x39 by 1 x 39
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean		1
39		.116432
		0.692

Sessão 12.6 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando os tratamentos BDC e 0.78 µg/mL

1= BDC; 78= 0.78 µg/mL

per_1x78 cod_1x78, bonferroni means st

Summary of per_1x78		
1 x 78	Mean	Std. Dev.
1	.87324001	.18409517
78	1.38263	.37540671
Total	1.127935	.38608289

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.518956307	1	.518956307	5.94	0.0507
Within groups	.524463682	6	.087410614		
Total	1.04341999	7	.149059998		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 1.2081 Prob>chi2 = 0.272

Comparison of per_1x78 by 1 x 78
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	1
78	.50939
	0.051 (Limítrofe)

Sessão 12.6.1 – Análise de Kruskal-Wallis comparando os tratamentos BDC e 0.78 µg/mL

1= BDC; 78= 0.78 µg/mL

```
kwallis per_1x78, by ( cod_1x78)
od_1x78      _Obs  _RankSum
      1          4      11.00
      78          4      25.00
chi-squared =    4.083 with 1 d.f.
probability =    0.0433
```

Sessão 12.7 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando os tratamentos 0.098 µg/mL e 0.78 µg/mL

98= 0.098 µg/mL; 78= 0.78 µg/mL

```
per_98x78 cod_98x78, bonferroni means st
```

Summary of médias 98x78		
98 x 78	Mean	Std. Dev.
78	1.38263	.37540671
98	.84413201	.32062873
Total	1.113381	.43279145

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.579960142	1	.579960142	4.76	0.0719
Within groups	.731198929	6	.121866488		
Total	1.31115907	7	.187308439		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.0637 Prob>chi2 = 0.801

Comparison of médias 98x78 by 98 x 78
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	78
98	-.538498
	0.072

Sessão 12.7.1 – Análise de Kruskal-Wallis comparando os tratamentos 0.098 µg/mL e 0.78 µg/mL

98= 0.098 µg/mL; 78= 0.78 µg/mL

```
. kwallis per_98x78, by ( cod_98x78)
cod_9~78      _Obs  _RankSum
      78          4      24.50
      98          4      11.50
chi-squared =   3.521 with 1 d.f.
probability =   0.0606
```

Sessão 13 – Quantificação de MDA

Sessão 13.1 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando todos os tratamentos

1= BDC; 2= DMSO; 98= 0.098 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; 39= 0.39 µg/mL; 78= 0.78 µg/mL

mda6 codmda, bonferroni means st

bdc=1	Summary of mdax6	
dms0=2 098	Mean	Std. Dev.
02 039 078		
-----+-----		
.2	.05333333	.01318585
.39	.05533333	.00250333
.78	.063	.01058301
1	.04133333	.01476031
2	.041	.00828654
98	.04533333	.00847742
-----+-----		
Total	.05041177	.01263261

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.002150902	5	.00043018	3.87	0.0086
Within groups	.003115333	28	.000111262		
Total	.005266235	33	.000159583		

Bartlett's test for equal variances: chi2(5) = 11.4048 Prob>chi2 = 0.044

Comparison of mdax6 by bdc=1 dms0=2 098 02 039 078
(Bonferroni)

Row Mean-					
Col Mean	.2	.39	.78	1	2
-----+-----					
.39	.002				
	1.000				
.78	.009667	.007667			
	1.000	1.000			
1	-.012	-.014	-.021667		
	0.881	0.438	0.020		
2	-.012333	-.014333	-.022	-.000333	
	1.000	0.666	0.047	1.000	
98	-.008	-.01	-.017667	.004	.004333
	1.000	1.000	0.107	1.000	1.000

Sessão 13.2 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando BDC, DMSO e 0.098 µg/mL

1= BDC; 2= DMSO; 98= 0.098 µg/mL;

mda cod1298, bonferroni means st

1=bdc x		
2=dms0 x	Summary of mda	
098	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
1	.04133333	.01476031
2	.041	.00828654
98	.04533333	.00847742
-----+-----		
Total	.04275	.01070514

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.000064333	2	.000032167	0.25	0.7804
Within groups	.001654667	13	.000127282		
Total	.001719	15	.0001146		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 1.8226 Prob>chi2 = 0.402

Comparison of mda by 1=bdc x 2=dms0 x 098
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	1	2
-----+-----		
2	-.000333	
	1.000	
98	.004	.004333
	1.000	1.000

Sessão 13.3 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando 0.20, 0.39 e 0.78 µg/mL

.2= 0.20 µg/mL; 39= 0.39 µg/mL; 78= 0.78 µg/mL

oneway mda023978 cod023978, bonferroni means st

Summary of mda023978		
	Mean	Std. Dev.
02 x 39 x 78		
.2	.05333333	.01318585
39	.05533333	.00250333
78	.063	.01058301
Total	.05722222	.01021277

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.000312444	2	.000156222	1.60	0.2337
Within groups	.001460667	15	.000097378		
Total	.001773111	17	.000104301		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 9.2928 Prob>chi2 = 0.010

Comparison of mda023978 by 02 x 39 x 78
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean	.2	39
39	.002		
	1.000		
78	.009667	.007667	
	0.331	0.595	

Sessão 13.3.1 – Análise de Kruskal-Wallis comparando 0.20, 0.39 e 0.78 µg/mL

kwallis mda02x78, by (cod02x78)

cod02x78	_Obs	_RankSum
.2	6	32.00
78	6	46.00

chi-squared = 1.256 with 1 d.f.
probability = 0.2623

Sessão 13.4 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando BDC, DMSO e 0.20 µg/mL

1= BDC; 2= DMSO; .2= 0.20 µg/mL;

mda12x02 cod12x02, bonferroni means st

		Summary of 1 x 2 x 02	
1 x 2 x 02		Mean	Std. Dev.
.2		.05333333	.01318585
1		.04133333	.01476031
2		.041	.00828654
Total		.04575	.01345858

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.000552333	2	.000276167	1.66	0.2283
Within groups	.002164667	13	.000166513		
Total	.002717	15	.000181133		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.9891 Prob>chi2 = 0.610

Comparison of 1 x 2 x 02 by 1 x 2 x 02
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean	.2	1
1		-.012	
		0.394	
2		-.012333	-.000333
		0.488	1.000

Sessão 13.5 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando BDC, DMSO e 0.39 µg/mL

1= BDC; 2= DMSO; 39= 0.39 µg/mL;

mda12x39 cod12x39, bonferroni means st

Summary of mda1x2x039		
1 x 2 x 39	Mean	Std. Dev.
1	.04133333	.01476031
2	.041	.00828654
39	.05533333	.00250333
Total	.0465	.01176435

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.000749333	2	.000374667	3.67	0.0544
Within groups	.001326667	13	.000102051		
Total	.002076	15	.0001384		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 10.2287 Prob>chi2 = 0.006

Comparison of mda1x2x039 by 1 x 2 x 39
(Bonferroni)

Row Mean-	1	2
Col Mean		
2	-.000333	1.000
39	.014	.014333
	0.096	0.140

Sessão 13.5.1 – Análise de Kruskal-Wallis comparando BDC e 0.39 µg/mL

mda1x39, by (cod1x39)

cod1x39	_Obs	_RankSum
1	6	27.00
39	6	51.00

chi-squared = 3.692 with 1 d.f.
probability = 0.0547

Sessão 13.5.2 – Análise de Kruskal-Wallis comparando DMSO e 0.39 µg/mL

kwallis mda2x39, by (cod2x39)

cod2x39	_Obs	_RankSum
2	4	10.00
39	6	45.00

chi-squared = 6.545 with 1 d.f.
probability = 0.0105

Sessão 13.6 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando BDC, DMSO e 0.78 µg/mL

1= BDC; 2= DMSO; 78= 0.78 µg/mL

mda12x78 cod12x78, bonferroni means st

		Summary of mda078	
1 x 2 x 78		Mean	Std. Dev.
1		.04133333	.01476031
2		.041	.00828654
78		.063	.01058301
Total		.049375	.01557295

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.001782417	2	.000891208	6.24	0.0126
Within groups	.001855333	13	.000142718		
Total	.00363775	15	.000242517		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 1.1642 Prob>chi2 = 0.559

Comparison of mda078 by 1 x 2 x 78
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	1	2
2	-.000333	1.000
78	.021667	.022
	0.023	0.041

Sessão 13.7 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando 0.098, 0.20 e 0.39 µg/mL

98= 0.098 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL; 39= 0.39 µg/mL;

mda980239 cod980239, bonferroni means st

98 x 0.2 x 39		Summary of mda039	
		Mean	Std. Dev.
.2		.05333333	.01318585
39		.05533333	.00250333
98		.04533333	.00847742
Total		.05133333	.00968929

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.000336	2	.000168	2.00	0.1698
Within groups	.00126	15	.000084		
Total	.001596	17	.000093882		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 9.2944 Prob>chi2 = 0.010

Comparison of mda039 by 98 x 0.2 x 39
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean	.2	39
39		.002	
		1.000	
98		-.008	-.01
		0.454	0.235

Sessão 13.7.1 – Análise de Kruskal-Wallis comparando 0.098 e 0.39 µg/mL

kwallis mda98x39, by (cod98x39)

cod98x39	_Obs	_RankSum
39	6	51.00
98	6	27.00

chi-squared = 3.692 with 1 d.f.
probability = 0.0547

Sessão 13.7.2 – Análise de Kruskal-Wallis comparando 0.20 e 0.39 µg/mL

. kwallis mda0239, by (cod02x39)

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

cod980239	_Obs	_RankSum
.2	6	39.00
39	6	39.00

chi-squared = 0.000 with 1 d.f.
probability = 1.0000

Sessão 13.8 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando 0.098 e 0.20 µg/mL

98= 0.098 µg/mL; .2= 0.20 µg/mL;

Var98 x 0.2 cod98 x 0.2, bonferroni means st

Summary of mda02		
cod	Mean	Std. Dev.
.2	.05333333	.01318585
98	.04533333	.00847742
Total	.04933333	.01136448

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.000192	1	.000192	1.56	0.2397
Within groups	.001228667	10	.000122867		
Total	.001420667	11	.000129152		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.8595 Prob>chi2 = 0.354

Comparison of 98 x 0.2 by cod
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	.2
98	-.008
	0.240

Sessão 13.8.1 – Análise de Kruskal-Wallis comparando 0.098 e 0.20 µg/mL

kwallis mda02x98, by (cod02x98)

cod02x98	_Obs	_RankSum
.2	6	45.50
98	6	32.50

chi-squared = 1.083 with 1 d.f.
probability = 0.2980

Sessão 13.9 – Análise de Bonferroni e Fisher comparando 0.098 e 0.78 µg/mL

98= 0.098 µg/mL; 78= 0.78 µg/mL

```
mda98x78 co98x78, bonferroni means st
```

		Summary of 98 x 78	
98 x 78		Mean	Std. Dev.
78		.063	.01058301
98		.04533333	.00847742
Total		.05416667	.01298834

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.000936333	1	.000936333	10.18	0.0096
Within groups	.000919333	10	.000091933		
Total	.001855667	11	.000168697		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.2219 Prob>chi2 = 0.638

Comparison of 98 x 78 by 98 x 78
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean		78
98		-.017667
		0.010

Sessão 13.9.1 – Análise de Kruskal-Wallis comparando 0.098 e 0.78 µg/mL

```
kwallis mda98x78, by ( co98x78)
```

co98x78	_Obs	_RankSum
78	6	55.00
98	6	23.00

chi-squared = 6.564 with 1 d.f.
probability = 0.0104