

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

Stella Marys Christóforo Hinojosa Salazar

Estratégias adaptativas de microbiota de água ao estresse induzido por
herbicidas

PONTA GROSSA
2016

STELLA MARYS CHRISTÓFORO HINOJOSA SALAZAR

Estratégias adaptativas de microbiota de água ao estresse induzido por herbicidas

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 A. V. Pileggi

PONTA GROSSA

2016

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

S161 Salazar, Stella Marys Christóforo Hinojosa
Estratégias adaptativas de microbiota
de água ao estresse induzido por
herbicidas/ Stella Marys Christóforo
Hinojosa Salazar. Ponta Grossa, 2016.
168f.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Sônia A. V.
Pileggi.

1.Biodegradação de herbicidas.
2.Peroxidação lipídica. 3.Respostas
antioxidativas. 4.Lipídios de membrana.
5.Água de lavagem. I.Pileggi, Marcos. II.
Pileggi, Sônia A. V.. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 575

UEPG

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. 06/2016

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 **Stella Marys Christóforo Hinojosa Salazar**.

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, no auditório do Programa, 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) **Stella Marys Christóforo Hinojosa Salazar**, 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. Wellington Luiz de Araújo (USP) e Drª Rosilene Aparecida Prestes (UTFPR). 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: "**Estratégias adaptativas de microbiota de água ao estresse induzido por herbicidas e antibióticos**". 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: "**Estratégias adaptativas de microbiota de água ao estresse induzido por herbicidas**"

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de dois mil e dezesseis.

Prof. Dr. Marcos Pileggi (UEPG)

Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo (USP)

Prof. Dr. Rosilene Aparecida Prestes (UTFPR)

Agradecimentos

A Deus por sempre iluminar meu caminho.

Ao Cnpq e a CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Marcos Pileggi pela oportunidade. Por toda paciência, orientação, ideias, elogios, críticas, sugestões que foram essenciais para meu crescimento profissional.

À minha co-orientadora Sônia Alvim Pileggi pelo apoio e dedicação.

À banca pelo tempo dedicado para fazer parte desse momento importante.

À professora Jesiane por não ter medido esforços para me auxiliar durante todo o Mestrado. Aos professores Péricles, Rafael e Rosilene pelo auxílio.

Aos professores e alunos do laboratório de Genética pelo empréstimo de equipamentos.

Aos companheiros de laboratório que facilitaram o trabalho: Bruno, Paloma, Fernanda, Ricardo, Jana, Alyne, Evelyn e Jhenifer.

As amigas Janinha e Eliz pela amizade, dedicação, apoio e companheirismo. Agradeço especialmente à Janinha, por ter sido meu anjo da guarda neste laboratório. Jamais me esquecerei do que você fez.

Às minhas amigas Marilise e Helena por terem me apoiado e compreendido minhas ausências.

Ao meu pai, pela amizade, confiança e apoio incondicional. Nunca mediu esforços para me auxiliar nessa caminhada, inclusive participando ativamente dos meus experimentos no laboratório. À minha mãe, por ser minha melhor amiga e conselheira. Agradeço todas as orações, carinho, apoio e elogios. Não conseguiria sucesso algum sem vocês. São as pessoas mais importantes da minha vida. Agradeço por serem minha fortaleza. Todo meu esforço é e sempre será para orgulhar vocês. Amo muito vocês!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, para a realização desse projeto.

“O que faço é uma gota no oceano,
mas sem esta gota o oceano seria menor”

Madre Teresa de Calcutá

Resumo

Os herbicidas são substâncias capazes de controlar populações de plantas daninhas, uma vez que competem por luz, água, nutrientes e espaço físico com as culturas agrícolas. Estes podem permanecer no ambiente tempo suficiente para injuriar outras culturas, resultar em contaminação de solos, cursos d'água e causar efeitos danosos para organismos não-alvos, gerando desequilíbrios ecológico e biológico. O 2,4-D foi sintetizado durante a Segunda Guerra Mundial, com o propósito de aumentar a produção agrícola deste período. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético, de fórmula $C_8H_6Cl_2O_3$, está entre os herbicidas mais utilizados e estudados mundialmente. A linhagem *Enterobacter ludwigii*, é uma enterobactéria retirada de água presente em tanques de lavagens de embalagens de herbicidas e foi selecionada por degradar o 2,4-D. O objetivo deste trabalho foi avaliar se um ambiente extremo pode selecionar linhagens bacterianas com estratégias adaptativas. A taxa de degradação foi avaliada por cromatografia líquida. As atividades de CAT e SOD foram avaliadas em PAGE não-desnaturante. As taxas de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram medidas em espectrofotômetro. Meio Mineral sem herbicida foi utilizado como controle. O Antibiograma foi analisado pelo método de discos de inibição. Através dos dados de peróxido de hidrogênio, foi possível observar que o herbicida em maior concentração, estava sendo o agente causador de estresse oxidativo. As taxas de MDA na maior concentração do herbicida, mostraram-se menores com o passar do tempo, possivelmente devido a uma mudança da permeabilidade da membrana celular em resposta à toxicidade do herbicida. Esta linhagem apresentou resistência em quatro dos cinco antibióticos selecionados. Esta linhagem de bactéria, apresentando degradação a um xenobiótico inédito a ela e resistência a antibióticos, torna-se um modelo de estudo interessante para a compreensão da evolução em ambientes com alta pressão seletiva.

Palavras-chave: Biodegradação de herbicidas, peroxidação lipídica, resposta antioxidativa, lipídios de membrana, água de lavagem, 2,4-D.

Abstract

Herbicides are chemicals capable of controlling weeds in agricultural crops, as they compete with cultivars for light, water, nutrients and physical space. These products can remain in the environment long enough to injure other crops, resulting in soil and waterways contamination, and cause harmful effects to non-target organisms, generating ecological and biological imbalances. The herbicide 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, $C_8H_6Cl_2O_3$) was synthesized during World War II, with the purpose of increasing the agricultural production, and is one of the most widely used and studied herbicide worldwide. *Enterobacter ludwigii* is an enterobacterium isolated from water, used to wash herbicide flasks, and was found to degrade 2,4-D. The objective of this work was to evaluate if an extreme environment can select bacterial strains with adaptive strategies. The rate of degradation was obtained by liquid chromatography. The activities of CAT and SOD enzymes were evaluated on non-denaturing PAGE. The rates of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were measured in a spectrophotometer. Mineral medium with no herbicide was used as control in all experiments. Antibioqram was analyzed by the method of agar diffusion using filter paper disks. Through the hydrogen peroxide data, it was possible to observe that the herbicide higher concentration was the agent causing oxidative stress. MDA rates at the highest concentration of the herbicide were lower over time, possibly due to a change in permeability in response to the toxicity of the herbicide. This strain showed resistance to four of the five selected antibiotics. This particular strain of bacterium, presenting degradation to a novel xenobiotic and resistance to antibiotics, becomes an interesting model for studying and understanding the evolution in environments with high selective pressure.

Keywords: Herbicides biodegradation, lipids peroxidation, antioxidative response, membrane lipids, 2,4-D.

Lista de Abreviaturas e Siglas

BSA – Albumina de soro bovino (Bovine serum albumin)

CAT – Catalase

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DTT – Ditionitrito

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

ERO – Espécies reativas de oxigênio

HPPD – 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase

LB – Caldo Luria (Luria Broth)

MDA – Malondialdeído

MNBA – Ácido-4-metilsulfonil-2-nitrobenzólico

MM – Meio Mineral

MTT – (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-brometo de difeniltetrazol)

NBT – Nitroazul tetrazólio

PBS – Solução tampão de fosfato (Phosphate buffer solution)

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida (PoliAcrilamide Gel Electrophoresis)

PVPP – Polivinilpirrolidona

RPM – Rotações por minuto

SOD – Superóxido dismutase

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TBA – Ácido-2-tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

2,4-D – Ácido 2,4 diclorofenoxiacético

Lista de Figuras

Figura 1 – Fórmula estrutural do herbicida 2,4 D	16
Figura 2 – Curva de crescimento de <i>E. ludwigii</i>	42
Figura 3 – Viabilidade Celular	44
Figura 4 – Taxas de malondialdeído (MDA).....	45
Figura 5 – Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	46
Figura 6 – Cromatogramas de degradação.....	48
Figura 7 - Caracterização das isoformas de SOD-PAGE não-desnaturante....	49
Figura 8 – SOD-PAGE não-desnaturante.....	50
Figura 9 – Atividade da CAT	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Herbicidas presentes nos tanques de lavagens	41
Tabela 2 – Antibiograma	52

Anexos

Anexo 1 – Identificação da linhagem.....	81
Anexo 2 – Crescimento Celular	82
Anexo 3 – Viabilidade Celular	88
Anexo 4 – MDA	126
Anexo 5 – Peróxido de Hidrogênio	147

Sumário

1.INTRODUÇÃO	13
1.1. Agroquímicos e contaminação ambiental	13
1.2 Degradação	14
1.3 Caracterização do 2,4 D	16
1.4 Sistema antioxidante de resposta	18
1.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)	19
1.4.2 Catalase (CAT)	20
1.5 Estrutura de lipídios de membrana	21
1.6 Antimicrobianos	21
2. OBJETIVO	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Linhagem bacteriana	24
3.2 Identificação molecular por meio do gene 16S rRNA	24
3.3 Condições de crescimento bacteriano	25
3.5 Reagentes para Cromatografia líquida em alta eficiência (CLAE)	25
3.6 Avaliação de degradação do herbicida por CLAE	26
3.7 Condições CLAE	26
3.8 Viabilidade Celular	26
3.9 Peroxidação lipídica	27
3.10 Quantificação de Peróxido de Hidrogênio	27
3.11 Extração de proteínas	28
3.12 Quantificação de proteínas	28
3.13 Atividades das enzimas antioxidativas	28
3.13.1 Atividade de SOD em PAGE não-desnaturante	29
3.13.2 Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não-desnaturante	29
3.13.3 Atividade da CAT em PAGE não-desnaturante	30
3.15 Antibiógrama	30
3.16 Análises Estatísticas	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Introdução	32
4.2 Material e Métodos	34
4.3 Resultados e Discussão	41
4.3.1 Caracterização da linhagem tolerante ao 2,4-D	41
4.3.2 Cinética de crescimento da linhagem em relação ao 2,4-D	42

4.3.3 Viabilidade Celular	43
4.3.4 Avaliação da peroxidação lipídica por meio da quantificação de MDA	44
4.3.5 Avaliação do estresse oxidativo gerado pelo 2,4-D.....	46
4.3.6 Capacidade de degradação do herbicida 2,4-D	47
4.3.7 Atividade da SOD	49
4.3.8 Atividade da CAT	50
4.3.9 Resistência a antibióticos.....	52
4.4 Conclusão.....	54
4.5. REFERÊNCIAS	55
5. Referências gerais.....	64
6. Anexos	81

1.INTRODUÇÃO

1.1. Agroquímicos e contaminação ambiental

A utilização de agroquímicos iniciou-se em 1941, como arma química principalmente. Após à Segunda Guerra Mundial, começaram a ser utilizados como herbicidas, para controle de ervas daninhas de folhas largas (OLIVEIRA et al., 2011).

A Legislação Brasileira define agroquímicos como substâncias utilizadas na produção, armazenamento e beneficiamento na agricultura, pastagem, proteção de florestas e outros ambientes, para preservá-los de seres nocivos. Também são considerados como agroquímicos as substâncias e produtos usados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (STOPELLI & MAGALHÃES, 2005).

No mundo, cerca de 2,27 milhões de toneladas de agroquímicos são lançados anualmente no ambiente (VERCREAENE-EAIRMAL et al., 2010). Na última década, o Brasil alcançou a posição de maior consumidor mundial de agroquímicos (LONDRES, 2011; ANVISA, 2012; SBANO et al., 2013).

Dentre os agroquímicos, os herbicidas são substâncias capazes de controlar populações de plantas daninhas em uma cultura agrícola, uma vez que competem por luz, água, nutrientes e espaço físico com as culturas (JUNIOR et al., 1997). Podem ser utilizados em pré-emergência ou pós-emergência. Neste último caso, o produto é absorvido em sua maior parte via foliar.

Embora nenhum herbicida permaneça indefinidamente no ambiente, alguns podem apresentar persistência por tempo suficiente para limitar ou injuriar outras espécies de culturas, resultar em contaminação e causar efeitos danosos em organismos não-alvos (OLIVEIRA et al., 2011; VAN EERD et al., 2003). Estima-se que apenas 0,1% dos agroquímicos atinjam o alvo; o restante permanece no ambiente, podendo causar a contaminação de solo e cursos d'água, ar e desequilíbrios biológicos e ecológicos (SHARMA et al., 2010; JARDIM et al., 2009).

Van der Linden et al. (2009) consideram que os métodos atuais de avaliação das taxas de lixiviação de herbicidas podem estar subestimando estes valores. Herbicidas podem ser deslocados a partir de sítios de aplicações. Estes compostos, quando encontrados em águas superficiais podem ser perigosos, atingindo organismos que não deveriam ser seus alvos primários (WITTMER et al., 2010).

Segundo Chaves (2007), no ano de 1974, no Estado do Paraná, constatou-se que 84% de amostras colhidas nos rios apresentaram resíduos de herbicidas e que 78% desses resíduos mantiveram-se na água mesmo depois do tratamento convencional. Vörösmarty et al. (2010) relatam que aproximadamente 80% da população humana está exposta a herbicidas presentes na água. Além da contaminação ambiental, herbicidas podem alterar os nutrientes presentes no solo, o metabolismo e a diversidade de comunidades de micro e macro-organismos. Muitos destes compostos têm efeitos fisiológicos negativos em animais e especificamente em humanos, sendo que alguns são mutagênicos, cancerígenos e teratogênicos (BENSALAH et al., 2011).

Os agroquímicos também podem prejudicar negativamente o ciclo de carbono e nitrogênio, essenciais para a manutenção da fertilidade do solo, devido a seu potencial efeito tóxico sobre a diversidade microbiana (DING et al., 2009).

1.2 Degradação

O destino dos herbicidas no ambiente depende da sua taxa de aplicação, das suas propriedades físico-químicas, do transporte e processos de transformação no solo e na água (PAYRAUDEAU & GREGOIRE, 2012). Estes processos incluem oxidação abiótica e redução, hidrólise, biodegradação e fotólise (SCHNOOR et al., 1991). A persistência de um herbicida no solo depende de processos de dissipação, como a degradação, que podem estar relacionados com o metabolismo microbiano (NAKAGAWA et al., 2000).

Quando ocorre a aplicação de um herbicida e a molécula ativa chega ao solo, ela pode sofrer processos de degradação e sorção. Os resultados desses

processos podem ser a absorção das moléculas pelas plantas ou lixiviação, podendo atingir solo e até cursos d'água subterrâneos. Também pode ocorrer a formação de outras moléculas, originadas pela degradação incompleta do herbicida, e que são considerados resíduos com diferentes graus de toxicidade (PRATA, 2000). O acúmulo de herbicidas no meio ambiente é dependente das condições físicas e químicas do solo, condições climáticas e microbiota presente no local (KONDA & PAZTOR, 2001). Os herbicidas podem influenciar ainda na expressão de genes responsáveis por ativar proteínas capazes de degradar herbicidas (SIMON & DANIEL, 2011; KOZDRÓJ & VAN-ELSAS, 2001).

A contaminação ambiental é uma preocupação recorrente devido ao elevado e frequente uso de herbicidas. Para diminuição desta contaminação, alguns processos químicos ou biológicos podem ser adotados, como a biorremediação, que é um processo biotecnológico que consiste em inocular no solo, ou em outro ambiente, microrganismos capazes de metabolizar os xenobióticos, transformando-os em produtos menos tóxicos ao meio ambiente. A decomposição biológica dos herbicidas é a melhor e mais importante forma de remover esses xenobióticos do ambiente (DABROWSKA et al., 2004).

Fungos e bactérias são os principais microrganismos degradadores de xenobióticos. Esses microrganismos podem degradar os poluentes em um efeito interativo, dependendo da biodiversidade encontrada no solo, como no cometabolismo ou no consórcio (SILVA, 2007; CHUKWUMA et al., 2012; PENNY et al., 2010).

Outro processo de biorremediação é por bioaugmentação, no qual há um aumento da biomassa microbiana que contém microrganismos capazes de degradar os xenobióticos. A biomassa pode ser obtida por meio de modificações genéticas nos microrganismos inseridos, ou pela indução de microrganismos indígenas para desenvolver mecanismos de degradação em ambiente natural (NYUK-MIN & JUNG-CHENG, 2012).

1.3 Caracterização do 2,4 D

Como dito anteriormente, durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), os herbicidas foram utilizados como arma química e, a partir de então, ocorreu produção, expansão e síntese de diversos compostos químicos (STOPELLI & MAGALHÃES, 2005).

Nos anos 40, iniciou-se a síntese do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Figura 1), desenvolvido com o objetivo de aumentar a produção agrícola (OLIVEIRA et al., 2011).

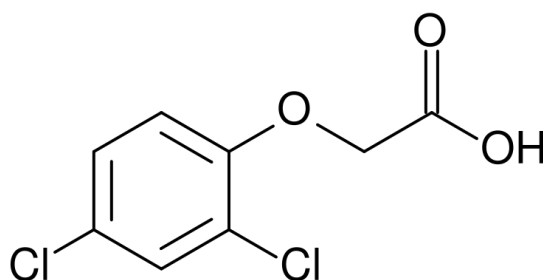


Figura 1. Fórmula estrutural da molécula do ácido 2,4-D.

Zimmerman e Hitchcock (1942), descreveram o 2,4 D pela primeira vez como regulador de plantas. Alguns agroquímicos tiveram seu uso proibido após a Guerra; a Agência de Proteção Ambiental dos EUA, proibiu o uso do ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), utilizado como agente-laranja juntamente com o 2,4-D, na Guerra do Vietnã e do fenoprop, em 1979, devido à potenciais riscos oncogênicos, teratogênicos e fetotóxicos (GINTAUTAS et al., 1992). Outros herbicidas pertencentes ao grupo de herbicidas ácidos fenoxialcanóicos, não tiveram seu uso proibido, sendo deste grupo, o 2,4-D um dos mais comumente utilizados no mundo (FRUMKIN, 2003; GINTAUTAS et al., 1992; WORTHING & HANCE, 1991).

O 2,4-D - $C_8H_6Cl_2O_3$, massa molecular = 221,0 g/mol (AMARANTE JUNIOR et al., 2003) é um ácido orgânico com pka de 2,6 e muito solúvel em água (SILVA et al., 2007).

Os herbicidas disponíveis no mercado, utilizando 2,4-D contém este ácido fenoxi ativo em várias formas, incluindo ácido, sais e ésteres (TOMLIN et al., 2009). A polaridade do 2,4-D está relacionada ao modo como se apresenta comercialmente, sendo que sua maior polaridade é obtida nas formas salinas (ANVISA, 2012). Os ésteres são mais ativos em comparação com ácidos e sais. No entanto, eles precisam ser incorporados logo após a aplicação pois tem a desvantagem de serem muito voláteis (PERNAK et al., 2012).

Baixas concentrações de 2,4-D são utilizadas como reguladoras de crescimento de plantas para induzir a formação de calos. A produção e o consumo do 2,4-D tem crescido rapidamente nos últimos anos, e em 2010, a produção deste herbicida atingiu 40.000 toneladas na China (LIU et al., 2013).

De acordo com as Nações Unidas, o 2,4-D é produzido em 15 países, e faz parte da formulação de 231 produtos comerciais (BALAGUÉ et al., 2001).

O 2,4-D tem sido pesquisado por cientistas e Agências reguladoras de diferentes governos por mais de seis décadas. Devido à longevidade e extensão de utilização, este herbicida está entre os agroquímicos mais profundamente estudados no que diz respeito às suas propriedades ambientais. Sua elevada solubilidade em água facilita a sua migração para cursos naturais, e também é conhecido o seu significativo tempo de vida de cerca de 20 dias e que seus produtos degradados irão acumular em solo/água (PICHAT et al., 1993).

Exposição acidental ou ocupacional de animais e de humanos ao 2,4-D e seus derivados pode ocorrer. Concentrações superiores a 300 mg/kg para gado e 67 mg/kg para humanos são necessárias para produzir manifestações clínicas de toxicidade (LEE et al., 2001). Além disso, as impurezas de dibenzo-p-dioxinas e dibenzofuranos (PCDD/Fs) e bifenilos policlorados (PCB) em produtos do 2,4-D podem exercer influência negativa sobre a saúde humana e o ambiente (LIU et al., 2013).

O 2,4-D é considerado perigoso (Classe III), quanto ao potencial de periculosidade ambiental (PPA), parâmetro que leva em consideração a bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade e os potenciais mutagênico, teratogênico e carcinogênico. É avaliado como altamente transportável e muito tóxico em ambientes aquáticos. É pouco tóxico para organismos de solo, aves e abelhas (IBAMA, 2012; VIEIRA et al., 1999).

Atribui-se ao 2,4-D a classificação toxicológica máxima (Classe I). Pode atacar o fígado, o sistema nervoso central e o coração em mamíferos; no ser humano, uma inalação prolongada pode gerar efeitos agudos como tonturas, tosse, fraqueza e até perda temporária de coordenação muscular (KAMRIN, 1997; VIEIRA et al., 1999). Os efeitos principais e mais recorrentes provêm de manipulação inadequada do produto, que pode gerar irritação na pele e nos olhos (KAMRIN, 1997).

1.4 Sistema antioxidante de resposta

O modo de ação de herbicidas está associado à capacidade de gerar estresse oxidativo. Sendo assim, para se entender o sistema de respostas de bactérias em contato com estes xenobióticos, estes conceitos precisam ser levantados.

Os produtos do metabolismo aeróbico são altamente reativos, como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\cdot$), conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO). Os alvos biológicos da alta reatividade das ERO são DNA, RNA, proteínas e lipídios (CABISCOL et al., 2000).

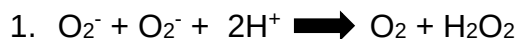
As ERO são originadas por meio da redução do O_2 , (CABISCOL et al., 2000; GARG & MANCHANDA, 2009). Estas espécies são radicais livres que possuem um elétron desemparelhado, centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio. Por esta razão, são altamente reativos (BARREIROS et al., 2006).

A detoxificação de ERO é realizada por várias enzimas antioxidantes importantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases

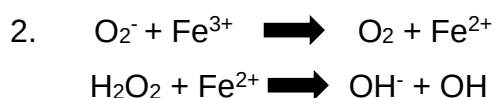
(IMLAY, 2008). Estas constituem a parte enzimática do sistema antioxidante de resposta. Em um trabalho de Mabury e Crosby (1994), o 2,4-D apresentou-se mais reativo que os herbicidas conhecidos atrazina e quinclorac. Alguns herbicidas tem a capacidade de interagir com a membrana celular em bactérias, inativando enzimas de extrema importância, como as envolvidas na cadeia transportadora de elétrons (KRAYL et al., 2003). Porém, algumas linhagens tolerantes e/ou degradadoras desenvolvem sistemas para resistir a estes herbicidas, como por exemplo, aumentando a produção ou atividade de enzimas do sistema antioxidante (LI et al., 2009).

1.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD é uma enzima que controla a concentração de O_2^- e H_2O_2 , substrato e produto da reação de Haber-Weiss, respectivamente (Reação 1) que dá origem ao radical OH^- . Atua, portanto, na defesa celular contra o risco de oxidação por estes radicais (MALSTRON et al., 1975; RYAN et al., 2010).



Problemas envolvidos com a presença da SOD incluem inativação de enzimas como a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase. Pode ocorrer a reação de Fenton (Reação 2), com a formação de OH^- que possui potencial oxidante, podendo reagir com qualquer molécula orgânica (BARREIROS et al., 2006).



Existem diferentes isoformas de SOD, que podem ser classificadas de acordo com o metal presente no sítio ativo: Manganês (Mn-SOD), Ferro (Fe-SOD), Cobre/Zinco (Cu/Zn-SOD) e Níquel (Ni-SOD). A Mn-SOD é encontrada em procariotos e mitocôndrias; a Fe-SOD em procariotos, algas e cloroplastos

de algumas plantas (SCANDALIOS, 2005); Cu/Zn-SOD em eucariotos, cloroplastos e em procariotos na região periplasmática (BATTISTONI, 2003). A Ni-SOD é a isoforma mais rara e foi encontrada em uma fração citosólica de actinobactérias do gênero *Streptomyces* (MATES, 2000).

1.4.2 Catalase (CAT)

O H₂O₂ tem capacidade de oxidar proteínas que apresentam resíduos de metionina e cisteína, ou grupos tiol muito reativos. Também pode conseguir reagir e transpor membranas citoplasmáticas, gerando OH⁻, podendo ser considerado como uma das ERO mais prejudiciais às células (BARREIROS et al., 2006).

A CAT tem como principal função impedir a formação do radical hidroxila, e devido à ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o H₂O₂, é considerada de importância para a sobrevivência de organismos aeróbicos (IMLAY, 2008). A CAT converte duas moléculas de H₂O₂ em uma molécula de O₂ e duas moléculas de H₂O (Reação 3), pela transferência de dois elétrons:



O modo de ação da CAT depende da concentração de H₂O₂. Em baixas concentrações, a CAT atua com ações peroxidativas, e em elevadas concentrações, atua de forma catalítica, formando H₂O e O₂ (SCANDALIOS, 2005). A CAT possui isoformas, HPI e HP II. Em *E. coli*, a HPI, codificada pelo gene *KatG*, é expressa sob condições aeróbias e anaeróbias, está sob regulação do fator transcricional *OxyR* e sua síntese é induzida quando as células são expostas às concentrações subletais do peróxido de hidrogênio (TRIGGS-RAINE et al., 1988). A HP II apresenta maior atividade durante a fase estacionária e em culturas aeróbicas (LOEWEN et al., 1996), pois seu controle é realizado pelo fator sigma *rpoS* (IVANOVA et al., 1994). Dentre todas as enzimas com

capacidade de degradar H_2O_2 , a CAT é a mais eficiente na sua eliminação, não ocorrendo a saturação da enzima, independentemente da concentração (SCANDALIOS, 2005).

1.5 Estrutura de lipídios de membrana

Bactérias expostas à condições estressantes, ativam uma resposta antioxidativa composta por enzimas. Os radicais livres provenientes do estresse oxidativo podem atacar diretamente ácidos graxos poliinsaturados nas membranas e iniciar o processo de peroxidação lipídica. Assim, os ácidos graxos são degradados em diversos produtos, como aldeídos, capazes de danificar proteínas. Além das enzimas, as bactérias possuem capacidade de modificar a composição dos ácidos graxos da membrana plasmática, bem como a saturação dos mesmos, condição frequentemente relatada principalmente em gram-negativas (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990; PETERSEN et al., 1994; HEIPEIPER et al., 1994).

A mudança de saturação de lipídios de membrana seria uma possível resposta adaptativa em bactérias para suportar um ambiente estressante causado pelo herbicida, evitando maiores danos celulares (LIMA & ABDALA, 2001). O ajuste na composição e estrutura de lipídios de membrana pode diminuir o gasto de energia e dificultar a entrada de xenobióticos na célula e otimizar o crescimento celular (OLCHANHESKI et al., 2014; BALAGUÉ et al., 2001). Além disso, bactérias podem modificar a saturação e fluidez da membrana para se adaptar às alterações de fase de crescimento (BAKHOLDINA et al., 2001).

1.6 Antimicrobianos

A maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo antibióticos, são anteriores por bilhões de anos à aplicação extensiva de antibióticos pelo ser humano, e a resistência dos patógenos humanos já apareceu em vigor desde metade do século passado, o que corresponde ao momento de seu uso

comercial em medicina e agricultura (KURENBACH et al., 2015). A exposição de um composto que não se destina a ser um agente antimicrobiano pode induzir uma resistência cruzada. Embora haja conhecimento da toxicidade destes herbicidas, muito pouco se sabe sobre os efeitos subletais, que eles ou seus produtos tem nos microrganismos ou no microbioma humano (KURENBACH et al., 2015).

A vulnerabilidade geral das bactérias aos antimicrobianos pode estar na sua resposta ao estresse oxidativo, e muitas classes de antimicrobianos atuam, pelo menos em parte, por meio da geração de ERO (KOHANSKI et al., 2007; FOTI et al., 2012). Assim, a promoção de um surto de ERO pode aumentar a letalidade dos microrganismos. Em particular, o aumento de O_2^- poderia levar a um aumento de H_2O_2 e subsequentemente, o aumento de OH^- e morte celular (KOHANSKI et al., 2007; WANG & ZHAO, 2009).

Normalmente os organismos produzem O_2^- , durante a respiração (FANG, 2004, 2013; IMLAY, 2013). O O_2^- é subsequentemente convertido em H_2O_2 , que por meio da reação de Fenton gera a hidroxila altamente reativa, OH^- . Juntas, essas ERO podem danificar os componentes celulares vitais e são, portanto, implantados pelo sistema imunitário para combater patógenos infecciosos. Em vários estudos, têm-se mostrado que as ERO podem sensibilizar bactérias infecciosas aos antibióticos, o que sugere uma eventual utilidade terapêutica (KEREN et al., 2013; LIU & IMLAY, 2013; EZRATY et al., 2013). Uma vez que a Organização Mundial da Saúde e os Centros de Controle de Doença e Prevenção dos EUA emitiram relatórios sobre a contínua e crescente problematização da resistência aos antibióticos (KURENBACH et al., 2015), o uso de ERO neste contexto pode ser interessante.

Metodologias para melhorar seletivamente ERO, incluindo O_2^- , estão sendo desenvolvidas para uma melhor compreensão destes processos (KEREN et al., 2013; LIU & IMLAY, 2013; EZRATY et al., 2013) mas também para se avaliar o potencial terapêutico (KOHANSKI et al., 2007; FOTI et al., 2012; BRYNILDSEN et al., 2013; DHARMARAJA & CHAKRAPANI, 2014).

2. OBJETIVO

Avaliar se um ambiente extremo, com diferentes substâncias tóxicas, pode selecionar linhagens bacterianas com estratégias específicas ou gerais de adaptação, tendo como modelo um xenobiótico inédito para a bactéria.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a capacidade de uma linhagem bacteriana, isolada de tanques de lavagens de embalagens de herbicidas, de crescimento e de tolerância ao 2,4-D, herbicida não presente nesta água.
- Caracterizar a indução de ERO pelo herbicida.
- Analisar o sistema enzimático antioxidativo da linhagem bacteriana em resposta ao 2,4-D.
- Determinar se houve modificações na saturação de lipídios em resposta à exposição ao xenobiótico.
- Verificar se o ambiente extremo analisado pode induzir respostas em outros sistemas, como resistência a antibióticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem bacteriana

Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de água de dois tanques (5 mil litros (L) de capacidade), a qual foi utilizada para lavagem de embalagens de diferentes herbicidas. A linhagem foi identificada a partir do gene 16S rRNA, foi selecionada dentre microrganismos tolerantes ao 2,4 D e separada para teste de degradação.

3.2 Identificação molecular por meio do gene 16S rRNA

As culturas bacterianas foram obtidas a partir de isolados em placa contendo Luria Broth + ágar (LA) 20 g L⁻¹ e incubadas a 30°C até a fase exponencial de crescimento. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores universais 27F: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1492R: 5' - ACGGCTACCTTGTACGACTT-3'. O programa de PCR utilizado foi: 2min a 94°C, 25 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto e 15 segundos a 72°C e uma extensão a 72°C por 10 minutos. Em seguida, os produtos da PCR foram tratados com 5,2 U de exonuclease e 0,77 U de SAP (shrimp alkaline phosphatase – Fermentas), e incubados a 37°C por 1 hora, seguindo com a inativação das enzimas a 80°C por 30 minutos. Os amplificadores do gene 16S rRNA foram sequenciados utilizando-se os mesmos primers da amplificação, com BigDye® Terminator v 3.1 CycleSequencing Kit (Applied Biosystems) no sequenciador de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems).

As extremidades das sequências do gene 16S rRNA com valor de Phred menor que 20 foram removidas (EWING et al., 2005). As sequências derivadas dos primers 27F e 1492R foram analisadas pelo programa Phrap e uma sequência consenso de aproximadamente 1400 pb foi gerada utilizando o programa Consed (GORDON et al., 2004). Para classificação taxonômica, as sequências foram comparadas com o banco de dados de 16S rRNA do National Center for Biotechnology Information, GenBank.

3.3 Condições de crescimento bacteriano

Os meios utilizados foram: Caldo Luria (LB: 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl), Meio Mineral (MM: 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7.0; 3 g L⁻¹ NaNO₃; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄; 0,5 g L⁻¹ KCl; 0,01 g L⁻¹ FeSO₄; 0,04 g L⁻¹ CaCl₂; 0,001 MnSO₄ e 0,4% glucose), MM1 (MM com 0,0017 mM de 2,4-D: 1x FR [Dose de campo]) e MM10 (MM com 0,017 mM de 2,4-D: 10 x FR).

O pré-inóculo foi obtido pelo crescimento da linhagem em LB em fase *log* de crescimento (20h de incubação). As células foram centrifugadas a 10.000 g e lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS: 8 g L⁻¹ de NaCl; 0,2 g L⁻¹ de KCl; 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄; 0,24 g L⁻¹ de KH₂PO₄). O pré-inóculo foi transferido para cada tratamento em uma D.O. (densidade óptica) inicial de 0,05 a 600 nm, sendo diluídas as amostras sempre que as leituras atingissem valores de aproximadamente 0,6, sendo os valores multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

3.4 Herbicidas

A formulação comercial utilizada foi o Aminol 806® (Milenia Agro Ciências), com ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (ácido 2,4-D), na concentração de 806 g L⁻¹.

3.5 Reagentes para Cromatografia líquida em alta eficiência (CLAE)

A acetonitrila (J.T. Baker, Philipsburg, PA, USA) utilizada foi grau CLAE e o ácido fosfórico (Synth, Diadema, SP, Brazil) utilizado foi o P.A. A água foi purificada com sistema Milipore Milli-Q. A coluna utilizada foi C18, Waters Superspher (15 mm x 0,39 mm - 4µm). As análises foram realizadas no sistema de CLAE Waters 2695. A detecção dos compostos foi monitorada pelo detector foto-diodo (detector DAD 200-400 nm) a 254 nm.

3.6 Avaliação de degradação do herbicida por CLAE

Para determinar a capacidade de degradação do 2,4-D, a linhagem bacteriana foi crescida em 300 mL de LB em frascos de 500 mL e incubada a 30°C e agitação de 120 g. As células foram coletadas após 24 horas e centrifugadas a 10.000 g durante 7 minutos, a 4°C. O precipitado foi lavado duas vezes com PBS. As células foram ressuspensas em 100 mL do meio mineral e incubadas a 30°C em agitador orbital a 120 g. Alíquotas de 1 mL foram coletadas do meio de cultura na primeira hora e em 24 horas de incubação e centrifugadas a 12 g, a 2min. O sobrenadante (0,9 mL) foi congelado (-20°C) para posterior análise em CLAE. Antes das análises, as amostras foram descongeladas e filtradas em membranas de 0,22 µm de porosidade para injeção no cromatógrafo.

3.7 Condições CLAE

O volume de injeção foi de 50 µL com uma fase móvel constituída de água (acidificada com ácido fosfórico 0,1% - pH 3.2) (A) e Acetonitrila (B), iniciando em 55% água (0,1% ácido fosfórico) (A): 45% acetonitrila (B), subindo para 60% (B) em 6min, 100% (B) em 7min. Esse sistema foi mantido isocrático até 8min, e a coluna foi recondicionada em 45% (B) em 13 min. As separações cromatográficas foram realizadas a 20°C e um fluxo de 1 mL min⁻¹. Os compostos foram monitorados através do detector de foto-diodo (Detector DAD 200-400 nm) com acompanhamento a 254 nm.

3.8 Viabilidade Celular

A bactéria em suspensão (item 3.3) foi diluída em solução salina e homogeneizada em diluições seriadas. Amostras de 100 µL foram plaqueadas em triplicata em meio LA, e incubadas a 30°C por 24 horas para contagem subsequente de colônias.

3.9 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de malondialdeído (MDA), um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), método adaptado de Heath & Packer (1968). As células (item 3.3) foram centrifugadas após 15h, 20h e 25h de incubação a 10.000 *g* por 7min, a 4°C, e o precipitado foi macerado em nitrogênio líquido: 0,1 g do macerado de cada uma das amostras foi homogeneizado com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugados a 12 *g*, por 5min. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 0,25 mL e transferida para outro tubo juntamente com 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-maria por 30min, a 97°C, e resfriada com gelo por 10min. As concentrações de MDA foram monitoradas a 535 nm (leitura de todos os lipídios) e 600 nm (todos os lipídios, exceto MDA) e as suas concentrações foram calculadas utilizando um coeficiente de extinção de 155 mM cm⁻¹. A quantidade de MDA foi expressa em mmol mg⁻¹ de massa fresca.

3.10 Quantificação de Peróxido de Hidrogênio

Das células obtidas conforme descrito no item 3.3, [0,1 g foi macerado em nitrogênio líquido, homogeneizadas com TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 *g* por 15min, a 4°C], foram retiradas três alíquotas de 0,2 mL do sobrenadante e transferidas para triplicatas contendo 0,2 mL de uma solução tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7.5 e 0,8 mL da solução 1 M de KI cada. A solução foi acondicionada em banho de gelo por uma hora, seguida de 20min em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em 390 nm e os resultados foram expressos em µmol g⁻¹ de massa fresca (ALEXIEVA et al., 2001).

3.11 Extração de proteínas

Para a extração de proteínas, todos os passos foram realizados a 4°C. A cultura (item 3.3) foi centrifugada a 10.000 *g* por 7min, e o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado em 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7.5 contendo ácido etileno diamino tetracético 1 mM (EDTA), ditioneitol 3 mM (DTT) e polivinilpirrolidona 5% (PVPP) (AZEVEDO et al., 1998). O material foi centrifugado a 10.000 *g* por 30min, e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -80°C.

3.12 Quantificação de proteínas

Para as determinações da concentração de proteínas totais, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976), por meio de espectrofotometria em 595 nm. Os resultados da quantificação foram expressos em mg ml⁻¹.

3.13 Atividades das enzimas antioxidativas

As atividades enzimáticas de CAT e SOD foram determinadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Para a confecção dos géis (12% poliacrilamida) foi utilizado o protocolo descrito por Azevedo et al. (1998). Para gel de resolução foram utilizados 6 mL de solução de poliacrilamida 40% (Sigma); 1 mL de Tampão TRIS 3 M, pH 8.9 e 9 mL de água destilada. Como catalisadores utilizaram-se 35 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio 1%. Para o gel de empacotamento foram utilizados 1 mL de uma solução de poliacrilamida 40% (Sigma), 2,5 mL de Tampão TRIS 500 M, pH 6.7, 5,5 mL de água destilada. Como catalisadores utilizaram-se 20 µL de TEMED e 100 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.

3.13.1 Atividade de SOD em PAGE não-desnaturante

A atividade de SOD e a caracterização de suas isoformas foram realizadas em PAGE não-desnaturante. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp & Fridovich (1971). Ao final do tempo de corrida, os géis foram lavados com água deionizada e incubados no escuro, em temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio 7.8, EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, nitroazul tetrazólio (NBT) 0,1 mM e TEMED 0,3%. Ao final de 30min, a mistura de reação foi descartada, os géis lavados com água deionizada e colocados sob iluminação até o aparecimento das bandas.

3.13.2 Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não-desnaturante

Para a caracterização das isoformas de SOD, o gel foi dividido verticalmente em três partes após a corrida eletroforética. Uma parte foi imersa em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7.8. A segunda parte imersa em uma solução com 100 mL do mesmo tampão contendo 0,0292 g de EDTA e 0,0130 g de KCN, e a última foi imersa em solução do tampão já citado, acrescido de 0,0292 g de EDTA e 70 µL de H₂O₂ 30%. Os géis permaneceram imersos nas respectivas soluções de revelação por 20min; em seguida foram lavados com H₂O destilada e submetidos à revelação com NBT e riboflavina, como descrito anteriormente. Ao final da revelação, as bandas foram analisadas quanto à atividade, conforme o fator inibidor presente nos tratamentos. As isoformas foram classificadas como descrito por Guelfi et al. (2003): Cu/Zn-SOD quando inativada na presença de KCN e H₂O₂; Fe-SOD se a banda for inativada somente na presença de H₂O₂, sendo resistente ao KCN; e Mn-SOD se a isoforma for resistente aos dois tratamentos (AZEVEDO et al., 1998).

3.13.3 Atividade da CAT em PAGE não-desnaturante

A determinação da atividade de CAT foi realizada em PAGE não-desnaturante 12%, a 4°C e com corrente constante de 15 mA. Após o tempo de corrida (17h), o gel foi lavado em água deionizada (3x15min) e incubado por 10min em solução de H₂O₂ 0,003% (v/v), à temperatura ambiente, sob agitação em mesa oscilatória. Após esse período, o gel foi lavado em água deionizada e colocado por 10min em uma solução de FeCl₃ 1% e K₂Fe(CN)₆ 1% (m/v) sob agitação. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15min e os géis foram foto-documentados (AZEVEDO et al., 1998).

3.15 Antibiograma

As culturas bacterianas foram crescidas em meio de cultivo LB, e suspensas em solução salina e a concentração foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A cultura foi espalhada em Ágar Mueller Hinton (MHA) 36 g L⁻¹ (Extrato de carne 2,0 g L⁻¹, ácidos casamínos 17,5 g L⁻¹, amido 1,5 g L⁻¹, ágar 15 g L⁻¹), utilizando swabs. Em seguida, foram fixados discos contendo os antibióticos Ampicilina (10 milicentigramas (mcg)) Cloranfenicol (30 mcg), Ciprofloxacina (05 mcg), Kanamicina (30 mcg) e Tetraciclina (30 mcg). As placas de Petri foram incubadas a 30°C durante 24h, e a resistência/suscetibilidade a cada antibiótico foi avaliada de acordo com a medida do diâmetro (mm) do halo de inibição, de acordo com a técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer (1966).

3.16 Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas para os resultados de curva de crescimento, viabilidade celular, quantificação de MDA e de H₂O₂ por meio de Análise de Variância (ANOVA), com estatística de Bonferroni.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estratégias adaptativas de microbiota de água ao estresse induzido por herbicidas e antibióticos

Resumo

Os herbicidas são substâncias capazes de controlar populações de plantas daninhas em uma cultura agrícola, uma vez que competem por luz, água, nutrientes e espaço físico com as culturas. Estes podem permanecer no ambiente tempo suficiente para injuriar outras culturas, resultar em contaminação de solos, cursos d'água e causar efeitos danosos para organismos não-alvos, gerando desequilíbrios ecológico e biológico. O 2,4-D foi sintetizado durante a Segunda Guerra Mundial, com o propósito de aumentar a produção agrícola deste período. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético, de fórmula $C_8H_6Cl_2O_3$, está entre os herbicidas mais utilizados e estudados mundialmente. A linhagem *Enterobacter ludwigii*, é uma enterobactéria retirada de água presente em tanques de lavagens de embalagens de herbicidas e foi selecionada por degradar o 2,4-D. O objetivo deste trabalho foi avaliar se um ambiente extremo pode selecionar linhagens bacterianas com estratégias adaptativas. A taxa de degradação foi avaliada por cromatografia líquida. As atividades de CAT e SOD foram avaliadas em PAGE não-desnaturante. As taxas de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram medidas em espectrofotômetro. Meio Mineral sem herbicida foi utilizado como controle. O Antibiograma foi analisado pelo método de discos de inibição. Através dos dados de peróxido de hidrogênio, foi possível observar que o herbicida em maior concentração, estava sendo o agente causador de estresse oxidativo. As taxas de MDA na maior concentração do herbicida, mostraram-se menores com o passar do tempo, possivelmente devido a uma mudança da permeabilidade em resposta à toxicidade do herbicida. Esta linhagem apresentou resistência em quatro dos cinco antibióticos selecionados. Esta linhagem de bactéria, apresentando degradação a um xenobiótico inédito a ela e resistência a antibióticos, torna-se um modelo de estudo interessante para compreensão da evolução em ambientes com alta pressão seletiva.

Palavras-chave: Biodegradação de herbicidas, peroxidação lipídica, resposta antioxidativa, lipídios de membrana, água de lavagem, 2,4-D.

4.1 Introdução

Com a crescente população mundial, estimada em 7 bilhões de pessoas (ONU, 2012), surge a necessidade do aumento de produção de alimentos, por meio de novas tecnologias, visando otimizá-la e aumentá-la (DONALDSON, 2010). Desta forma, a utilização de herbicidas como componente crucial para o manejo e prevenção de plantas daninhas é inevitável. Embora nenhum herbicida permaneça indefinidamente no ambiente, alguns podem apresentar persistência por tempo suficiente para limitar ou injuriar outras espécies de culturas, resultar em contaminação e causar efeitos danosos em organismos não-alvo (OLIVEIRA et al., 2011; VAN EERD et al., 2003). Estima-se que apenas 0,1% dos herbicidas atinjam o alvo; o restante permanece no ambiente, podendo causar a contaminação do solo e cursos d'água, ar e desequilíbrios biológicos e ecológicos (SHARMA et al., 2010; JARDIM et al., 2009).

Apesar do Brasil não utilizar frequentemente grandes concentrações de herbicidas, comparado a outros países em desenvolvimento, o uso de agroquímicos tem aumentado consideravelmente (SCHREINEMACHERS & TIPRAQSA, 2012).

Em alternativa à degradação química, a degradação de xenobióticos por microrganismos é uma estratégia eficiente para remoção dessas moléculas no ambiente (DABROWSKA et al., 2004). Os processos de biodegradação e biorremediação microbiana constituem-se numa das áreas mais promissoras da biotecnologia (MARTINS et al., 2007; SILVA et al., 2007). Vários microrganismos podem ser potenciais remediadores como bactérias, fungos, algas e mesmo plantas. Para que isso ocorra em ambiente natural, é necessário que o local permita o crescimento desses microrganismos por meio de condições adequadas de pH, temperatura, oxigênio e disponibilidade de nutrientes (CHANDRAKANT, 2011).

O marco do controle químico ocorreu, em 1941, com a síntese do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (POKORNY, 1941). Zimmerman e Hitchcock (1942), descreveram o 2,4 D pela primeira vez como regulador de plantas. De

acordo com as Nações Unidas, o 2,4-D é produzido em 15 países, e faz parte da formulação de 231 produtos comerciais (BALAGUÉ et al., 2001).

O 2,4-D é considerado perigoso (Classe III), quanto ao potencial de periculosidade ambiental (PPA), parâmetro que leva em consideração bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade e os potenciais mutagênico, teratogênico e carcinogênico. É avaliado como altamente transportável e muito tóxico em ambientes aquáticos. É pouco tóxico para organismos de solo, aves e abelhas (IBAMA, 2012; VIEIRA et al., 1999).

Os produtos do metabolismo aeróbico são altamente reativos, como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO). Os alvos biológicos da alta reatividade das ERO são DNA, RNA, proteínas e lipídios (CABISCOL et al., 2000).

A detoxificação de ERO é realizada por várias enzimas antioxidantes importantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (IMLAY, 2008). Algumas linhagens tolerantes e/ou degradadoras desenvolvem sistemas para resistir a estes herbicidas, como por exemplo, aumentando a produção ou atividade de enzimas do sistema antioxidante (LI et al., 2009).

E. ludwigii demonstrou neste trabalho com análise de CLAE, conseguir degradar 20% o herbicida 2,4-D em 24 horas de incubação. O crescimento desta linhagem demonstrou que consegue tolerar até 10x a concentração do herbicida. Análises de antibiograma demonstraram resistência da linhagem para os antibióticos Ampicilina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Kanamicina e suscetibilidade à tetraciclina. O objetivo deste trabalho foi avaliar se um ambiente extremo, com diferentes substâncias tóxicas, pode selecionar linhagens bacterianas com estratégias específicas ou gerais de adaptação, tendo como modelo um xenobiótico inédito para a bactéria.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Linhagem bacteriana

Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de água de dois tanques (5 mil litros (L) de capacidade), a qual foi utilizada para lavagem de embalagens de diferentes herbicidas. A linhagem foi identificada a partir do gene 16S rRNA, foi selecionada dentre microrganismos tolerantes ao 2,4 D e separada para teste de degradação.

4.2.2 Identificação molecular por meio do gene 16S rRNA

As culturas bacterianas foram obtidas a partir de isolados em placa contendo Luria Broth + ágar (LA) 20 g L⁻¹ e incubadas a 30°C até a fase exponencial de crescimento. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores universais 27F: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1492R: 5' - ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. O programa de PCR utilizado foi: 2min a 94°C, 25 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto e 15 segundos a 72°C e uma extensão a 72°C por 10 minutos. Em seguida, os produtos da PCR foram tratados com 5,2 U de exonuclease e 0,77 U de SAP (shrimp alkaline phosphatase – Fermentas), e incubados a 37°C por 1 hora, seguindo com a inativação das enzimas a 80°C por 30 minutos. Os amplificadores do gene 16S rRNA foram sequenciados utilizando-se os mesmos primers da amplificação, com BigDye® Terminator v 3.1 CycleSequencing Kit (AppliedBiosystems) no sequenciador de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems).

As extremidades das sequências do gene 16S rRNA com valor de Phred menor que 20 foram removidas (EWING et al., 2005). As sequências derivadas dos primers 27F e 1492R foram analisadas pelo programa Phrap e uma sequência consenso de aproximadamente 1400 pb foi gerada utilizando o programa Consed (GORDON et al., 2004). Para classificação taxonômica, as sequências foram comparadas com o banco de dados de 16S rRNA do National Center for Biotechnology Information, GenBank.

4.2.3 Condições de crescimento bacteriano

Os meios utilizados foram: Caldo Luria (LB: 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl), Meio Mineral (MM: 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7.0; 3 g L⁻¹ NaNO₃; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄; 0,5 g L⁻¹ KCl; 0,01 g L⁻¹ FeSO₄; 0,04 g L⁻¹ CaCl₂; 0,001 MnSO₄ e 0,4% glucose), MM1 (MM com 0,0017 mM de 2,4-D: 1x FR [Dose de campo]) e MM10 (MM com 0,017 mM de 2,4-D: 10 x FR).

O pré-inóculo foi obtido pelo crescimento da linhagem em LB em fase *log* de crescimento (20h de incubação). As células foram centrifugadas a 10.000 g e lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS: 8 g L⁻¹ de NaCl; 0,2 g L⁻¹ de KCl; 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄; 0,24 g L⁻¹ de KH₂PO₄). O pré-inóculo foi transferido para cada tratamento em uma D.O. (densidade óptica) inicial de 0,05 a 600 nm, sendo diluídas as amostras sempre que as leituras atingissem valores de aproximadamente 0,6, sendo os valores multiplicados pelos fatores de diluição correspondentes.

4.2.4 Herbicidas

A formulação comercial utilizada foi o Aminol 806® (Milenia Agro Ciências), com ácido 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), na concentração de 806 g L⁻¹.

4.2.5 Reagentes para Cromatografia líquida em alta eficiência (CLAE)

A acetonitrila (J.T. Baker, Philipsburg, PA, USA) utilizada foi grau CLAE e o ácido fosfórico (Synth, Diadema, SP, Brazil) utilizado foi o P.A. A água foi purificada com sistema Milipore Milli-Q. A coluna utilizada foi C18, Waters Superspher (15 mm x 0,39 mm - 4µm). As análises foram realizadas no sistema de CLAE Waters 2695. A detecção dos compostos foi monitorada pelo detector foto-diodo (detector DAD 200-400 nm) a 254 nm.

4.2.6 Avaliação de degradação do herbicida por CLAE

Para determinar a capacidade de degradação do 2,4-D, a linhagem bacteriana foi crescida em 300 mL de LB em frascos de 500 mL e incubada a 30°C e agitação de 120 g. As células foram coletadas após 24 horas e centrifugadas a 10.000 g durante 7 minutos, a 4°C. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão PBS. As células foram ressuspensas em 100 mL do meio mineral e incubadas a 30°C em agitador orbital a 120 g. Alíquotas de 1 mL foram coletadas do meio de cultura na primeira hora e em 24 horas de incubação e centrifugadas a 12 g, a 2min. O sobrenadante (0,9 mL) foi congelado (-20°C) para posterior análise em CLAE. Antes das análises, as amostras foram descongeladas e filtradas em membranas de 0,22 µm de porosidade para injeção no cromatógrafo.

4.2.7 Condições CLAE

O volume de injeção foi de 50 µL com uma fase móvel constituída de água (acidificada com ácido fosfórico 0,1% - pH 3.2) (A) e Acetonitrila (B), iniciando em 55% água (0,01% ácido fosfórico) (A): 45% acetonitrila (B), subindo para 60% (B) em 6min, 100% (B) em 7min. Esse sistema foi mantido isocrático até 8min, e a coluna foi recondicionada em 45% (B) em 13min. As separações cromatográficas foram realizadas a 20°C e um fluxo de 1 mL min⁻¹. Os compostos foram monitorados através do detector de foto-diodo (Detector DAD 200-400 nm) com acompanhamento a 254 nm.

4.2.8 Viabilidade Celular

A bactéria em suspensão (item 4.2.3) foi diluída em solução salina e homogeneizada em diluições seriadas. Amostras de 100 µL foram plaqueadas em triplicata em meio LA, e incubadas a 30°C por 24 horas para contagem subsequente de colônias.

4.2.9 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de malondialdeído (MDA), um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), método adaptado de Heath & Packer (1968). As células (item 4.2.3) foram centrifugadas após 15h, 20h e 25h de incubação a 10.000 *g* por 7min, a 4°C, e o precipitado foi macerado em nitrogênio líquido: 0,1 g do macerado de cada uma das amostras foi homogeneizado com 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 0,1% e centrifugados a 12 *g*, por 5min. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 0,25 mL e transferida para outro tubo juntamente com 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-maria por 30min, a 97°C, e resfriada com gelo por 10min. As concentrações de MDA foram monitoradas a 535 nm (leitura de todos os lipídios) e 600 nm (todos os lipídios, exceto MDA) e as suas concentrações foram calculadas utilizando um coeficiente de extinção de 155 mM cm⁻¹. A quantidade de MDA foi expressa em mmol mg⁻¹ de massa fresca.

4.2.10 Quantificação de Peróxido de hidrogênio

Das células obtidas conforme descrito no item 4.2.3, [0,1 g foi macerado em nitrogênio líquido, homogeneizadas com TCA 0,1% e centrifugadas a 10.000 *g* por 15min, a 4°C], foram retiradas três alíquotas de 0,2 mL do sobrenadante e transferidas para triplicatas contendo 0,2 mL de uma solução tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7.5 e 0,8 mL da solução 1 M de KI cada. A solução foi acondicionada em banho de gelo por uma hora, seguido de 20min em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em 390 nm e os resultados foram expressos em μmol g⁻¹ de massa fresca (ALEXIEVA et al., 2001).

4.2.11 Extração de proteínas

Para a extração de proteínas, todos os passos foram realizados a 4°C. A cultura (item 4.2.3) foi centrifugada a 10.000 *g* por 7min, e o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado em 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7.5 contendo ácido etileno diamino tetracético. 1 mM (EDTA), ditioneitol 3 mM (DTT) e polivinilpirrolidona 5% (PVPP) (AZEVEDO et al., 1998). O material foi centrifugado a 10.000 *g* por 30min, e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -80°C.

4.2.12 Quantificação de proteínas

Para as determinações da concentração de proteínas totais, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976), por meio de espectrofotometria em 595 nm. Os resultados da quantificação foram expressos em mg ml⁻¹.

4.2.13 Atividades das enzimas antioxidativas

As atividades enzimáticas de CAT e SOD foram determinadas em géis não-desnaturantes de poliacrilamida (PAGE). Para a confecção dos géis (12% poliacrilamida) foi utilizado o protocolo descrito por Azevedo et al., 1998. Para gel de resolução foram utilizados 6 mL de solução de poliacrilamida 40% (Sigma); 1 mL de Tampão TRIS 3 M, pH 8.9, 9 mL de água destilada. Como catalisadores utilizaram-se 35 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio 1%. Para o gel de empacotamento foram utilizados 1 mL de uma solução de poliacrilamida 40% (Sigma), 2,5 mL de Tampão TRIS 500 M, pH 6.7 e 5,5 mL de água destilada. Como catalisadores utilizaram-se 20 µL de TEMED e 100 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.

4.2.14 Atividade de SOD em PAGE não-desnaturante

A atividade de SOD e a caracterização de suas isoformas foram realizadas em PAGE não-desnaturante. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp & Fridovich (1971). Ao final do tempo de corrida, os géis foram lavados com água deionizada e incubados no escuro, em temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio 7.8, EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, nitroazul tetrazólio (NBT) 0,1 mM e TEMED 0,3%. Ao final de 30min, a mistura de reação foi descartada, os géis lavados com água deionizada e colocados sob iluminação até o aparecimento das bandas.

4.2.15 Determinação das isoenzimas de SOD em PAGE não-desnaturante

Para a caracterização das isoformas de SOD, o gel foi dividido verticalmente em três partes após a corrida eletroforética. Uma parte foi imersa em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7.8. A segunda parte imersa em uma solução com 100 mL do mesmo tampão contendo 0,0292 g de EDTA e 0,0130 g de KCN, e a última foi imersa em solução do tampão já citado, acrescido de 0,0292 g de EDTA e 70 μ L de H₂O₂ 30%. Os géis permaneceram imersos nas respectivas soluções de revelação por 20min; em seguida foram lavados com H₂O destilada e submetidos à revelação com NBT e riboflavina, como descrito anteriormente. Ao final da revelação, as bandas foram analisadas quanto à atividade, conforme o fator inibidor presente nos tratamentos. As isoformas foram classificadas como descrito por Guelfi et al. (2003): Cu/Zn-SOD quando inativada na presença de KCN e H₂O₂; Fe-SOD se a banda for inativada somente na presença de H₂O₂, sendo resistente ao KCN; e Mn-SOD se a isoforma for resistente aos dois tratamentos (AZEVEDO et al., 1998).

4.2.16 Atividade da CAT em PAGE não-desnaturante

A determinação da atividade de CAT foi realizada em PAGE 12%, a 4°C e com corrente constante de 15 mA. Após o tempo de corrida (17h), o gel foi lavado em água deionizada (3x15min) e incubado por 10min em solução de H₂O₂ 0,003% (v/v), à temperatura ambiente, sob agitação em mesa oscilatória. Após esse período, o gel foi lavado em água deionizada e colocado por 10min em uma solução de FeCl₃ 1% e K₂Fe(CN)₆ 1% (m/v) sob agitação. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15min e os géis foram foto-documentados (AZEVEDO et al., 1998).

4.2.17 Antibiograma

As culturas bacterianas foram crescidas em meio de cultivo LB, e suspensas em solução salina e a concentração foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A cultura foi espalhada em MHA (Extrato de carne 2,0 g L⁻¹, ácidos casamínos 17,5 g L⁻¹, amido 1,5 g L⁻¹, ágar 15 g L⁻¹), utilizando swabs. Em seguida, foram fixados discos contendo os antibióticos Ampicilina (10 mcg), Cloranfenicol (30 mcg), Ciprofloxacina (05 mcg), Kanamicina (30 mcg) e Tetraciclina (30 cmg). As placas de Petri foram incubadas a 30°C durante 24h, e a resistência/suscetibilidade a cada antibiótico foi avaliada de acordo com a medida do diâmetro (mm) do halo de inibição, de acordo com a técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer (1966).

4.2.18 Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas para os resultados de curva de crescimento, viabilidade celular, quantificação de MDA e de H₂O₂ por meio de Análise de Variância (ANOVA), com estatística de Bonferroni.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Caracterização da linhagem tolerante ao 2,4-D

Este estudo foi realizado com amostras obtidas em tanques de armazenamento de água de lavagem de embalagens de herbicidas, cuja composição encontra-se na Tabela 1. Este ambiente foi considerado altamente tóxico e seletivo. O local de coleta foi o Centro de Recepção de Embalagens da empresa Basf Brasileira S/A Indústrias Químicas. A linhagem foi selecionada a partir de testes de tolerância ao herbicida 2,4-D em Meio Mineral com 1x 2,4-D (MM1). Foram realizadas análises de degradação em CLAE e a linhagem que apresentou maiores taxas foi selecionada para o projeto. A linhagem selecionada foi identificada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA como *Enterobacter ludwigii*, com 97% de identidade (Anexo 1).

Nome Comercial	Princípio Ativo
Roundup Original	Glifosato
Heat	Saflufenacil
Spider	Diclosulam
Classic	Clorimuron
Flumizin 500	Flumioxazina
Select	Cletodim
Poast	Setoxidim
Dual Gold	S-Metaclor
Primoleo	Atrazina
Primestra Gold	Atrazina+S-Metaclor
Sumisoya	Flumioxazina
Boral 500 SC	Sulfentrazone
Facet	Quinclorac

Tabela 1: Listagem de herbicidas cujas embalagens foram lavadas e a água utilizada foi armazenada em tanques nos quais foram obtidas as amostras.

A *Enterobacter ludwigii* pertence ao complexo de *Enterobacter cloacae*, a qual tem sido frequentemente isolada de infecções hospitalares. No entanto, não está claro se a mesma é um verdadeiro agente oportunista ou se tem caráter

comensal (PAAUW et al., 2008). Estudos tem relatado que patógenos humanos pertencentes à família Enterobacteriaceae tais como *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* podem colonizar plantas (HOLDEN et al., 2009).

Plantas servem frequentemente como hospedeiros para muitas bactérias entéricas incluindo *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea* e *Enterobacter*, que podem colonizar epífitas, endófitos e/ou patógenos. O gênero *Enterobacter* compreende uma gama de bactérias associadas à plantas que promovem controle biológico e/ou crescimento (TAGHAVI et al., 2009; MADHAIYAN et al., 2010).

4.3.2 Cinética de crescimento da linhagem em relação ao 2,4-D

O efeito do 2,4-D sobre o crescimento da linhagem *E. ludwigii* foi avaliado nas concentrações de 1x (MM1) e 10x (MM10) e os resultados estão demonstrados na Figura 2.

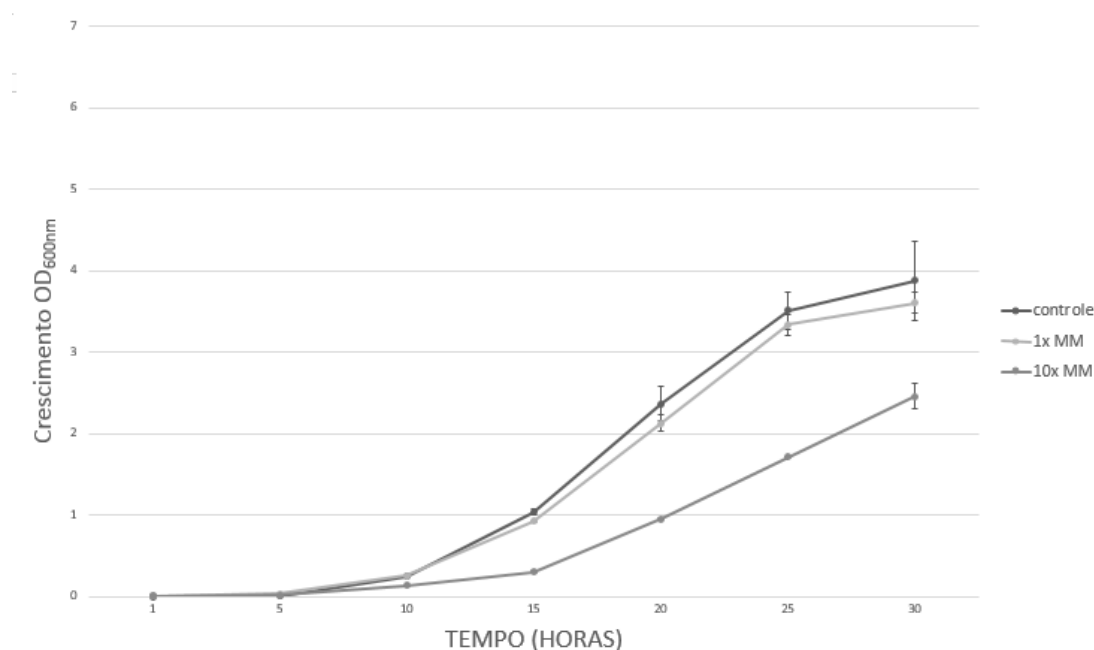


Figura 2: Curva de crescimento (OD em 600 nm) de *E. ludwigii* nos tratamentos MM (controle), MM1 e MM10 durante 30 horas de incubação.

Os tempos escolhidos para os demais experimentos, com base na curva obtida nas condições de controle, foram 3 pontos da fase *log*: 15h, para início da fase, 20h para um ponto mediano, e 25h para o final da fase. A curva no tratamento MM1 apresentou-se mais próxima do controle (MM) nos 3 tempos escolhidos ($p>0,705$, anexo 2, seção 1,2; $p>0,07$, anexo 2, seção 1,3; $p>1,00$, anexo 2, seção 1,4 respectivamente), diferentemente do que ocorreu com a curva do tratamento MM10, que apresentou diferença significativa com relação ao controle, nos três tempos definidos ($p<0,032$, anexo 2, seção 1,2; $p<0,004$, anexo 2, seção 1,3; $p<0,031$, anexo 2, seção 1,4 respectivamente). A tolerância de *E. ludwigii* ao herbicida pode ser explicada devido ao seu isolamento ter sido feito em água de lavagens que continham herbicidas. Entretanto, o 2,4-D não fazia parte da lista de herbicidas cujas embalagens foram lavadas e a água utilizada como amostra para o isolamento de bactérias (Tabela 1). Apesar de menor com relação a MM e MM1, esta bactéria apresentou uma boa taxa de crescimento no tratamento MM10 (Fig. 2), mostrando-se, portanto, tolerante. Altas concentrações de herbicidas podem selecionar linhagens tolerantes ou degradadoras de herbicidas (BATTISON et al., 2009). Nesse trabalho, a linhagem de *E. ludwigii* conseguiu tolerar uma concentração de 0,0017 mM de 2,4-D. Balagué et al. (2001), utilizaram as doses de 2 mM, 1 mM, 0,1 mM e 0,01 mM do herbicida 2,4-D, verificando inibição de crescimento de *E. coli* HB101 apenas na maior concentração. Entretanto, nestes trabalhos, diferentemente desse projeto, foi utilizado um sistema de seleção e de avaliação de degradação com 2,4-D. *E. ludwigii* apresentou taxas menores de crescimento (Fig. 2) em uma concentração que possivelmente não é encontrada na natureza, e cujo processo de seleção ocorreu sem a presença de 2,4-D, porém com outros compostos tóxicos (Tabela 1).

4.3.3 Viabilidade Celular

Já na viabilidade celular (Fig.3), foi possível observar que o controle não apresentou variações significativas em suas taxas ($p>0,068$, anexo 3, seção 2,4). Com relação ao tratamento MM1, foi possível observar uma diminuição das células viáveis no final da fase *log*, refletindo a toxicidade do herbicida ao longo

do tempo. No tratamento MM10, as células mostraram-se menos viáveis já no meio da fase *log* ($p < 0,019$, anexo 3, seção 2,2), A diferença nesse tratamento entre o início e o meio da fase *log* indica diferença significativa (kruskal-wallis $p < 0,0273$, anexo 3, seção 2,6), possivelmente devido à presença de uma maior concentração do herbicida em uma fase de maior metabolização celular, incorporando os efeitos tóxicos do 2,4-D com maior intensidade.

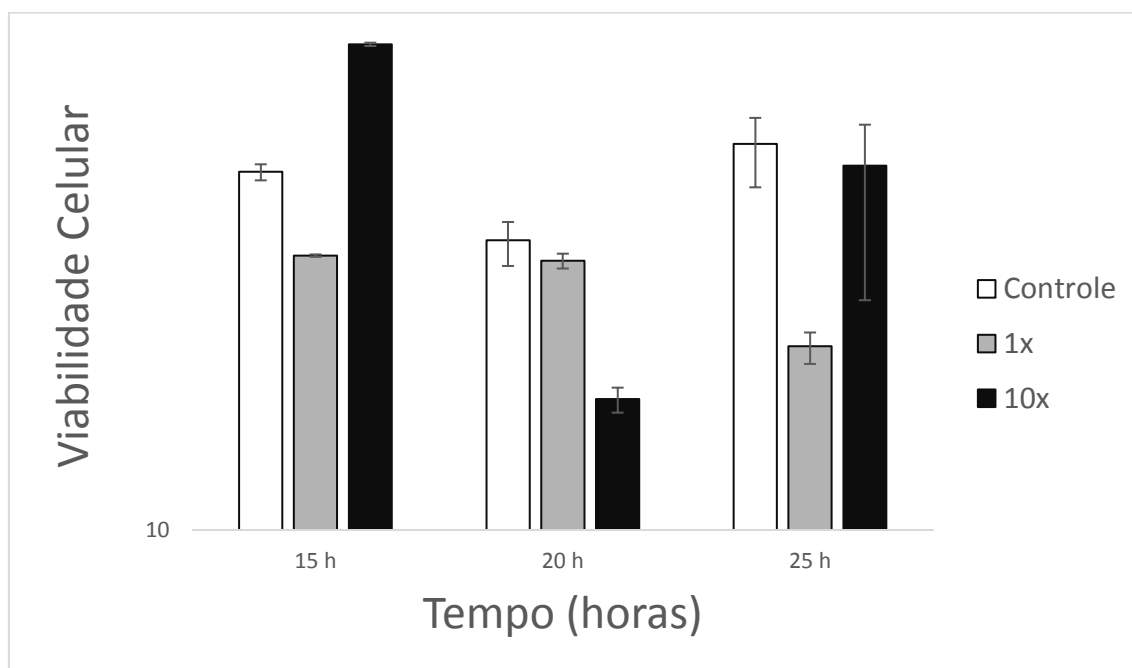


Figura 3: Viabilidade celular (em U.F.C.) de *E. ludwigii* nos tratamentos MM (controle), MM1 e MM10 nos tempos de 15h, 20h e 25h de incubação.

4.3.4 Avaliação da peroxidação lipídica por meio da quantificação de MDA

O MDA (malondialdeído) é utilizado para determinar a quantidade de peroxidação lipídica e a toxicidade de herbicidas, portanto um dos indicadores de estresse oxidativo (SHAO et al., 2009). Desta maneira, seria esperado um aumento da peroxidação lipídica com as maiores concentrações de 2,4-D no tratamento com a linhagem bacteriana. Entretanto, neste trabalho, obtivemos resultados opostos: o decréscimo do MDA com o passar do tempo, no tratamento de MM10 em relação ao controle (Fig.4). O MDA apresenta diferença entre 15 h

e 20 h ($p < 0,001$, anexo 4, seção 3,6) e entre 15 h e 25 h ($p < 0,002$, anexo 4, seção 3,6).

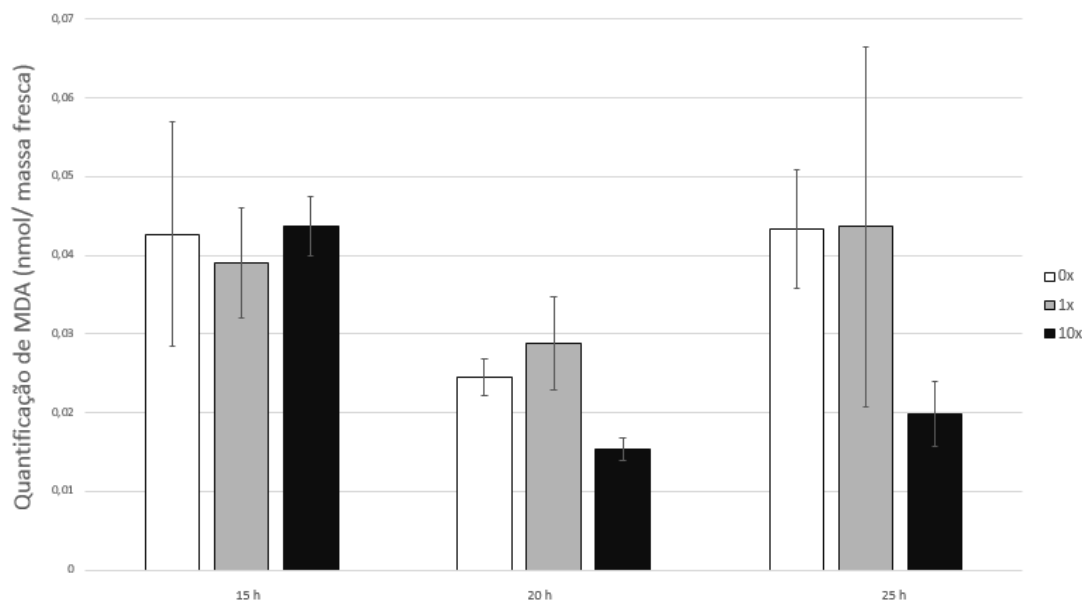


Figura 4: Níveis de MDA (representando peroxidação lipídica) em *E. ludwigii* nos tratamentos MM (controle), MM1 e MM10, nos tempos de 15h, 20h e 25h de incubação.

Prione et al. (2016, em preparação), apresentaram dados semelhantes com a linhagem de *P. ananatis* em relação ao herbicida mesotrione. Os dados de saturação de lipídios apresentaram modificações, sugerindo uma baixa permeabilidade de membrana, possivelmente um efeito protetor da bactéria contra a citotoxicidade provocada pelo herbicida.

Como a produção de MDA depende do nível de saturação de lipídios, mudanças na permeabilidade da membrana em resposta às altas concentrações do herbicida podem explicar os resultados obtidos. O estudo realizado por Balagué et al. (2001) com a linhagem *E. coli* HB101 e o 2,4-D demonstrou que a toxicidade do herbicida pode modificar a saturação de lipídios de membrana. Com esta alteração, a fluidez da membrana mostrou-se diminuída, por conseguinte, a produção de MDA que é relacionada e dependente do nível de saturação de lipídios, apresentou-se alterada, sendo que esta mudança pode ser interpretada como uma estratégia de defesa contra as ERO.

4.3.5 Avaliação do estresse oxidativo gerado pelo 2,4-D

Os herbicidas podem gerar ERO no meio intracelular de acordo com suas propriedades químicas (VOIE & FONNUM, 2000; COTEUR et al., 2001; RUIZ-LEAL & GEORGE, 2004; PAZMIÑO et al., 2011). A quantificação de H_2O_2 para *E. ludwigii* está apresentada na Fig. 5. Comparativamente aos dados de crescimento (Fig. 2) no tratamento MM10, é possível perceber aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio (Fig.4) ($p < 0,028$, anexo 5, seção 4,6). Comparando o tratamento MM10 nos tempos extremos (15h e 25h), é possível observar aumento da taxa de peróxido ($p < 0,028$, anexo 5, seção 4,6). O aumento na concentração de ERO para níveis que excedem a capacidade de defesa celular caracteriza o estresse oxidativo (MAHALINGAM & FEDEROFF, 2003). O organismo possui um sistema antioxidativo com a função de combater estes possíveis danos por meio de suas enzimas e sistemas não enzimáticos. Uma correlação entre os níveis de MDA e as taxas de H_2O_2 podem indicar este último como agente causador de estresse oxidativo (IŞIK et al., 2007).

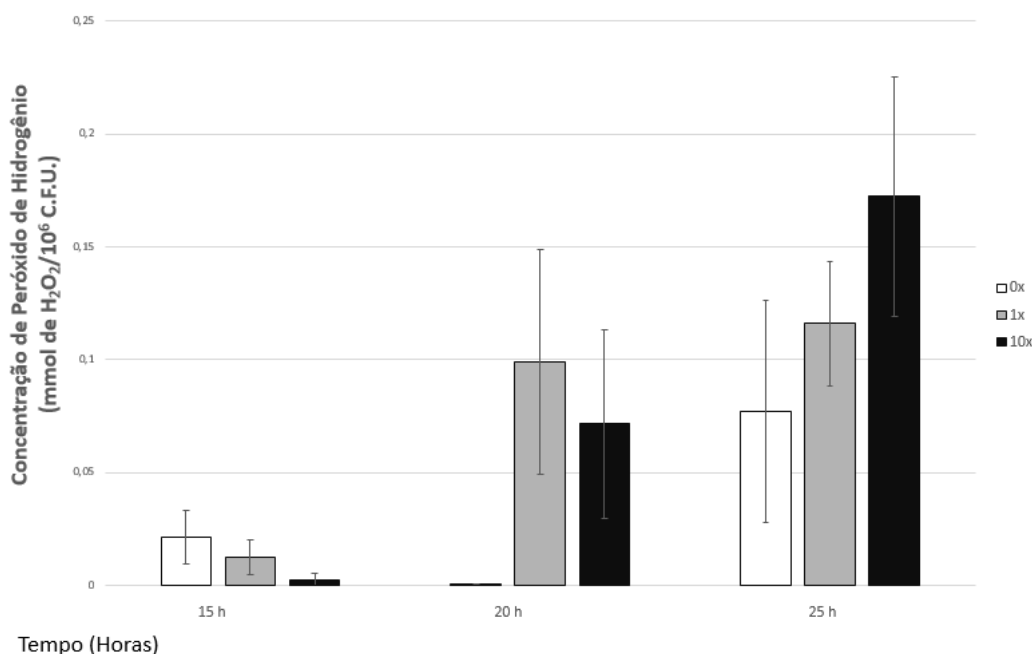


Figura 5: Quantificação de peróxido de hidrogênio nos tratamentos MM (controle), MM1 e MM10 após 15h, 20h e 25h de incubação.

4.3.6 Capacidade de degradação do herbicida 2,4-D

Uma das respostas adaptativas a herbicidas encontradas por alguns microrganismos tolerantes é a capacidade de metabolizar xenobióticos (ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2013).

A degradação microbiana de 2,4-D em solo começa com a remoção da cadeia lateral carboxila (posição 1-C) ou a ligação éter (posição 2-C) (FOSTER e McKERCHER, 1973; ROBERTS et al., 1998); formação de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e outros metabólitos fenólicos que são degradados por clivagem e oxidação do anel de fenila (SMITH & AUBIN, 1991a; ROBERTS et al., 1998). A completa mineralização de herbicidas é desejável do ponto de vista agro-ambiental, pois toda molécula de herbicida é reduzida a dióxido de carbono e outros compostos inorgânicos (SMITH & AUBIN, 1991b; BARRIUSO et al., 1997).

Diversas linhagens de bactérias já foram estudadas, a fim de elucidar seu papel na degradação de xenobióticos no ambiente, e com a finalidade prática de uma potencial utilização em processos de biorremediação, por exemplo *Enterobacter* sp. (TAN et al., 2013). *Pseudomonas cepacia* (COMEAU et al., 1993) e *Rhizobium* sp. (PERETTI et al., 1997) também demonstraram sua capacidade de utilizar 2,4-D como fonte de energia e carbono.

A análise da degradação do 2,4-D pela bactéria *E. ludwigii* foi realizada por meio de CLAE. Uma taxa de degradação de 20% foi observada em 24h de incubação, como mostrado na Figura 6.

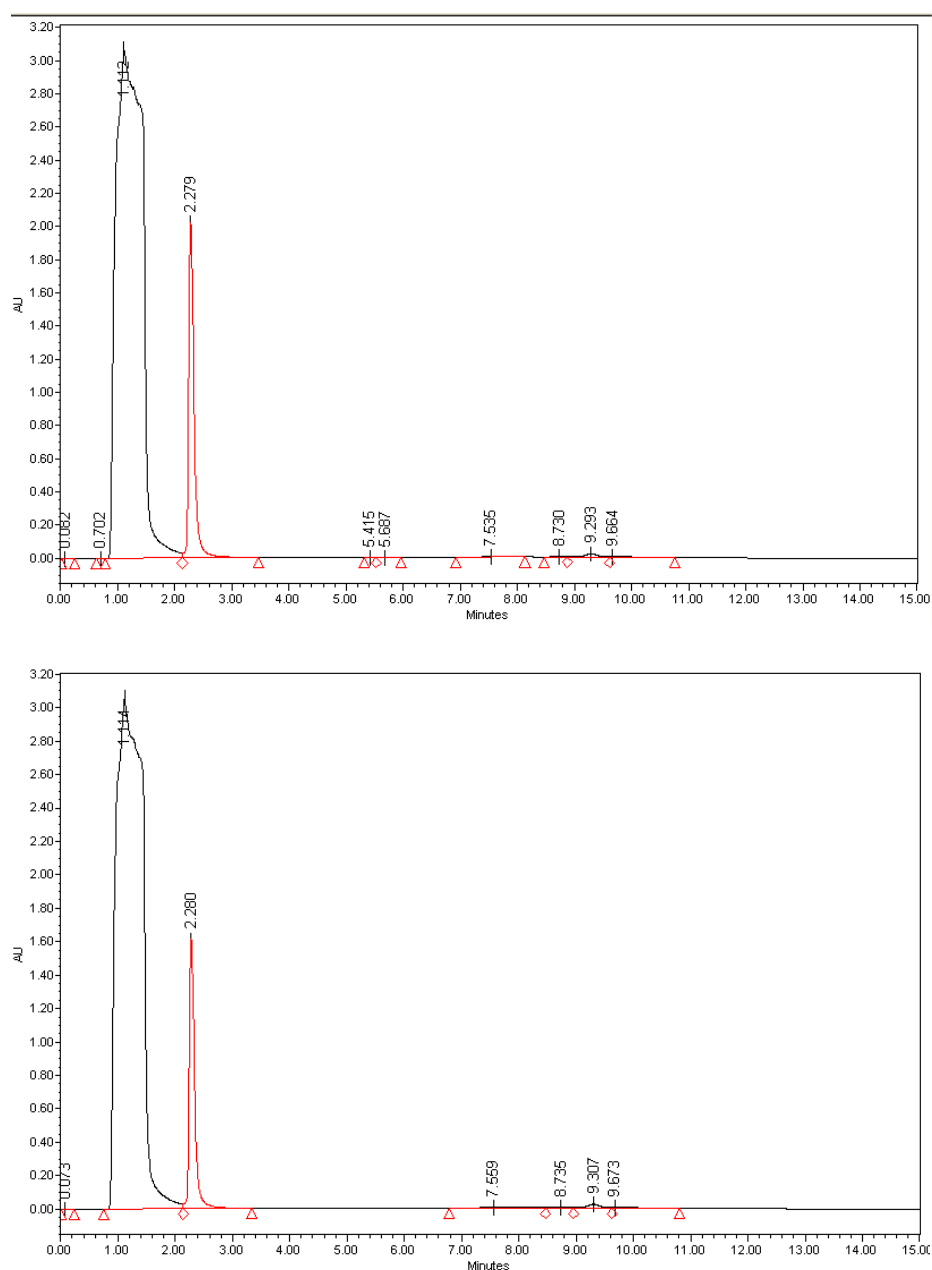


Figura 6: Cromatogramas indicando os picos correspondentes ao 2,4-D, em cultura com *E. ludwigii*. Gráfico superior: 0h de incubação em MM1. Gráfico inferior: 24h de incubação em MM1. Pico do 2,4-D observado no tempo de retenção de 2,280 min.

Lerch et al. (2009), observaram que em experimento de biodegradação do solo, metade da concentração inicial de 2,4-D foi mineralizada em 8 dias.

Em um trabalho realizado por Silva et al. (2007), com 2,4-D, com duas semanas de incubação em amostras de solo para análise de cromatografia líquida (CLAE), foram obtidos os seguintes resultados de degradação:

Acinetobacter sp: 0,25%, *Serratia marcescens*: 0,25%, *Stenothrophomonas maltophilia*: 30,20%, *Flavobacterium* sp: 10,10% e *Penicilium* sp.: 29,80%.

Musarrat et al (2000), observaram degradação de 2,4-D pelas linhagens de *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*, tendo 100% de degradação após 20 dias de incubação.

4.3.7 Atividade da SOD

As SOD são metaloenzimas multiméricas, e são distinguidas por seu cofator metal e sua localização celular (KEITH & VALVANO, 2007). Para manter o ambiente celular estável e evitar danos de estresse oxidativo, há um aumento na atividade de enzimas do sistema antioxidante de defesa (LIN et al., 2009; MISHRA & IMLAY, 2012; MA et al., 2013).

Três isoenzimas de Mn-SOD, caracterizadas como I, II e III (Fig. 7), se mostraram ativas em *Enterobacter ludwigii*. Mn-SODI e MnSOD-III foram mais ativas nos tempos de 15h e 20h, enquanto que Mn-SODII e Mn-SODIII apresentaram atividades menores no tempo de 25h (Fig. 7), principalmente nos tratamentos com o 2,4-D. A toxicidade do herbicida 2,4-D pode ser o motivo pela demora de resposta da SOD no tempo de 25h (Fig. 8).

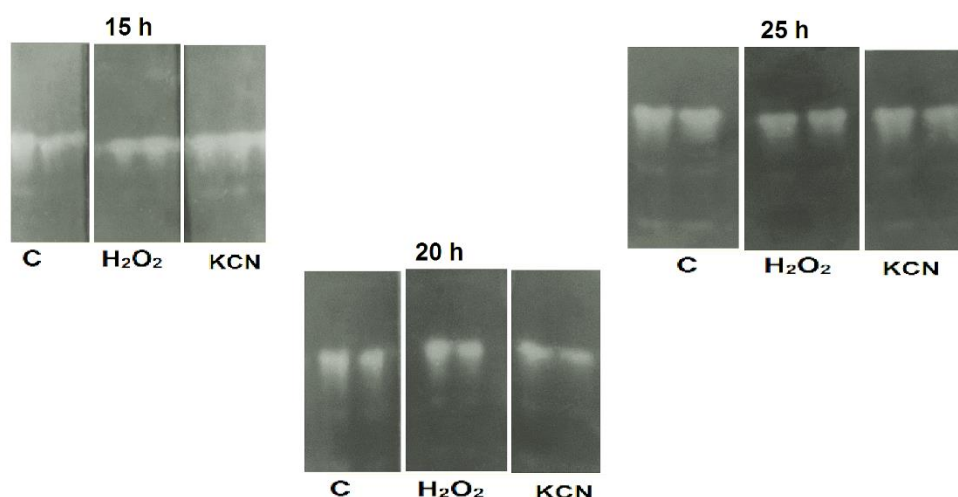


Figura 7: Atividade de PAGE não-desnaturante em *Enterobacter ludwigii*. correspondendo à atividade de Mn-SOD no controle (C); atividade de SOD na presença de 2 mM de peróxido de

hidrogênio (H_2O_2); atividade de SOD com 5 mM de cianeto de potássio (KCN), em 15h, 20h e 25h de incubação.

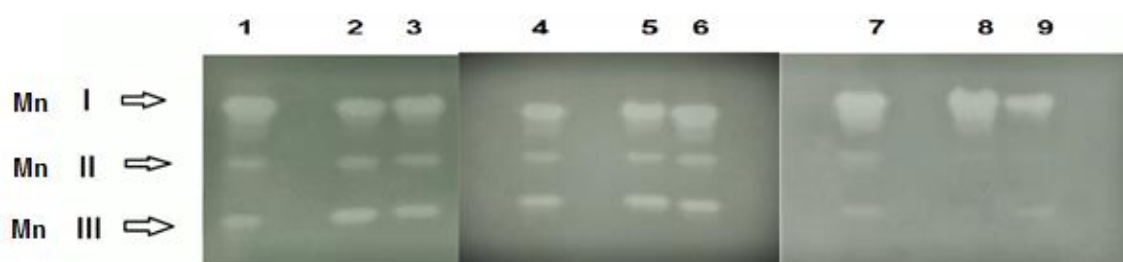


Figura 8: SOD-PAGE não-desnaturante de *E.ludwigii* representando controle (MM), MM1 e MM10 nos tempos de 15h (1,2,3) e 20h (4,5,6) e 25h (7,8,9).

As enzimas de SOD são classificadas de acordo com o cofator metal presente em seu sítio ativo, podendo ser diferenciadas em manganês (Mn) ou ferro (Fe), cobre/zinco (Cu/Zn) e níquel (Ni) (GRATÃO et al., 2005). Neste trabalho, as isoformas de SOD (Fig.8) apresentaram a metaloenzima Mn-SOD, isoforma encontrada no citoplasma bacteriano e responsiva ao aumento dos níveis do radical O_2^- (IMLAY, 2008; LI et al., 2009).

4.3.8 Atividade da CAT

De acordo com Imlay (2008), as enzimas peroxidases e catalases são reguladas por vias bioquímicas diferentes em bactérias. Enzimas como a tiorredoxina tiol-peroxidase e alquil hidroperóxido redutase e outras peroxidases também são responsáveis pela detoxificação celular do H_2O_2 e a CAT apresenta maior importância na degradação do peróxido de hidrogênio quando este está presente em altas concentrações dentro da célula, quanto neste momento, as outras enzimas peroxidases tem sua atividade saturada devido à lenta transferência de elétrons e/ou a inativação das mesmas por excesso de oxidação (MISHRA et al., 2012; MOLS et al., 2011; MONGKOLSUK et al., 2005; WOOD et al., 2003). O sistema antioxidante trabalha de maneira sistêmica a estes. A CAT possui isoformas, HPI e HPII. Em *E. coli*, a HPI, codificada pelo gene *KatG*, é expressa sob condições aeróbias e anaeróbias, está sob regulação do fator

transcricional *OxyR* e sua síntese é induzida quando as células são expostas às concentrações subletais do peróxido de hidrogênio (TRIGGS-RAINE et al., 1988). A HP11 apresenta maior atividade durante a fase estacionária e em culturas aeróbicas (LOEWEN et al., 1996), pois seu controle é realizado pelo fator sigma *rpoS* (IVANOVA et al., 1994).

Apenas uma isoforma foi observada nesse trabalho, diferentemente dos dados dos gêneros que apresentam duas isoformas. Quando as taxas de formação ou de entrada de H_2O_2 são elevadas, os níveis basais de defesa são insuficientes. Por esta razão, os organismos respondem a isso por aumento da síntese de catalases, peroxidases ou ambos (CARMEL-HAREL & STORZ, 2000). Mishra & Imlay (2012) relatam que muitas bactérias apresentam mais de uma isoenzima para catalase e demonstram que uma única enzima possivelmente não seja suficiente para a atividade da catalase, por diversos motivos, como a necessidade de múltiplas formas de compartimentalização, especificidades de substratos, necessidades do metal e estabilidade e demanda de elétrons. Apesar de ter sido encontrada apenas uma isoforma, a bactéria foi considerada tolerante a esta concentração de herbicida e apresentou um bom controle do estresse oxidativo, de acordo com sua relativa capacidade de crescimento (Fig.2).

Na atividade da CAT (Fig. 9), é possível perceber no tempo de 15h, início da fase *log* (Fig. 2), a isoforma em controle e MM1 aparecem com maior atividade em comparação com o tratamento MM10, demonstrando uma demora de resposta da CAT à maior concentração do herbicida. Esta demora da CAT pode explicar as maiores concentrações de H_2O_2 em resposta às altas doses de herbicida, possivelmente não encontradas naturalmente.

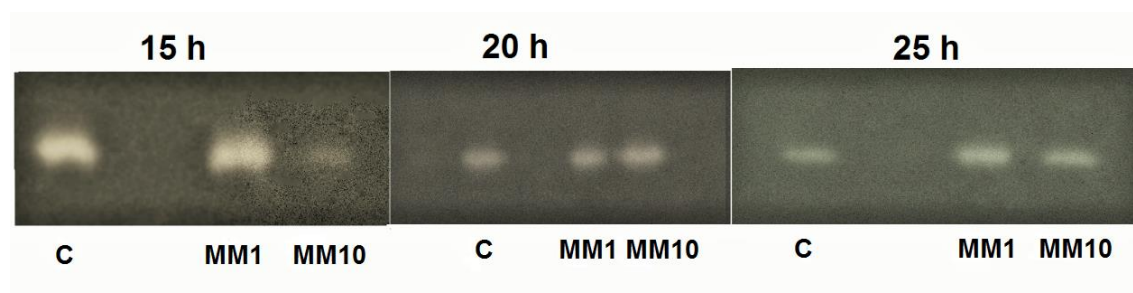


Figura 9: CAT-PAGE não-desnaturante de *Enterobacter ludwigii* representando: controle, MM1 e MM10, nos tempos de 15h, 20h e 25h de incubação.

4.3.9 Resistência a antibióticos

Na análise de antibiograma, realizado com os antibióticos Ampicilina (Amp; β -lactams), Ciprofloxacina (Cip; fluoroquinolonas), Cloranfenicol (Cam), Kanamicina (kan; aminoglicosídico) e Tetraciclina (Tet) como mostrados na Tabela 2, foi possível observar que a linhagem apresentou suscetibilidade apenas ao antibacteriano Tetraciclina.

Padrão Interpretativo/ Zonas de inibição em mm

<i>Antibacterianos</i>	Resistência	Resistência Intermediária	Suscetibilidade	Medição do halo (em mm)
<i>Ampicilina</i>	≤ 13	14-16	≥ 17	10
<i>Cloranfenicol</i>	≤ 12	13-17	≥ 18	17
<i>Ciprofloxacina</i>	≤ 15	16-20	≥ 21	15
<i>Kanamicina</i>	≤ 13	14-17	≥ 18	12
<i>Tetraciclina</i>	≤ 11	12-14	≥ 15	24

Tab. 2. Antibiograma. Avaliação de resistência e/ou suscetibilidade pela análise de medição de halos de inibição (em mm).

Os dados apresentados na tabela 2 foram retirados do Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI). Com relação ao antibacteriano Cloranfenicol, a linhagem *E. ludwigii* apresentou resistência intermediária, significando que ela encontra aplicação clínica em sítios corpóreos onde as drogas são fisiologicamente concentradas (ex: quinolonas e beta-lactâmicos na urina) ou quando uma alta dose de droga pode ser usada (ex: beta-lactâmico). A linhagem apresentou-se resistente aos demais antibióticos.

Do ponto de vista clínico, o uso inadequado de um grande número de antibióticos e a pressão seletiva associada à bactérias pode comprometer a eficácia a longo prazo da terapia feita com antibióticos. Concentrações subletais de biocidas podem criar maiores tolerâncias aos antibióticos (LEVY &

MARSHALL, 2004; MOLINA-GONZÁLEZ et al., 2014; CAPITA et al., 2014; KURENBACH et al., 2015). Em um trabalho realizado por Kurenbach et al. (2015), a linhagem *S. typhimurium* exposta à dose subletal de 2,4-D apresentou aumento na tolerância à Ampicilina, Cloranfenicol, Ciprofloxacina e Tetraciclina e maior suscetibilidade à Kanamicina. Comportamento semelhante foi observado quando *E. coli* foi exposta à dose subletal de 2,4-D, mas não houve aumento de tolerância à ampicilina.

4.4 Conclusão

Constatou-se que *E. ludwigii* pode tolerar o herbicida 2,4-D em até 10x sua concentração. Esta bactéria não apresentou diferenças de crescimento na presença de 1x a concentração do herbicida, porém em 10x apresentou uma menor taxa de crescimento. Os dados de peróxido demonstraram que em 10x, no final da fase *log*, o herbicida é o agente causal do estresse oxidativo. A CAT apresentou uma demora na resposta na maior concentração do herbicida. Esta demora pode explicar as maiores concentrações de H₂O₂ em resposta às altas doses de herbicida, possivelmente não encontradas naturalmente. *E. ludwigii* também se apresentou resistente a antibióticos. Considerando que a linhagem não teve contato prévio com 2,4-D e ainda assim demonstra-se tolerante a este herbicida e resistente a outros estressantes, como antibióticos, a linhagem apresenta um sistema amplo de resposta, se tornando um modelo interessante de estudo.

4.5. REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, L.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment** v.24, p.1337-1344, 2001.

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.

BALAGUÉ, C.; STÜRTZ, N.; DUFFARD, N.; DE DUFFARD, A. M. E. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical, composition, and cellular envelope. **John Wiley & Sons, Inc**, 2001.

BARRIUSO, E.; HOUOT, S.; SIERRA-WITTLING, C. Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicides. **Pesticide Science** v.67, p.211-221, 1997.

BATISSON, I.; CROUZET, O.; BESSE-HOGGAN, P.; SANCELME, M.; MANGOT, J. F.; MALLET, C.; BOHATIER, J. Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. **Environmental Pollution** v.157, p.1195-1201, 2009.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improve assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry** v.44, p.276-287, 1971.

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

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

CAPITA, R.; RIESCO-PELÁEZ, F.; ALONSO-HERNANDO, A.; ALONSO-CALLEJA, C. Exposure of *Escherichia coli* ATCC12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance of antimicrobials, and ultrastructure. **Applied and Environmental Microbiology** v.80, p. 1268-1280, 2014.

CARMEL-HAREL, O.; STORZ, G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Review of Microbiology*, v.54, p.61-439, 2000.

CHANDRAKANT, S. K.; SHWETHA, S. R. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme Research** v.7, 2011.

COMEAU, Y.; GREER, C.; SAMSON, R. Role of inoculum preparation and density on the bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.38, p.681-687, 1993.

COTEUR, G.; DANIS, B.; FOWLER S. W.; TEYSSIE, J. L.; DUBOIS, P.; WARNAU, M. Effects of PCBs on reactive oxygen species (ROS) production by the immune cells of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). **Marine Pollution Bulletin** v. 42(8), p. 667-72, 2001.

DABROWSKA, D.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. The importance of degradation in the fate of selected organic compounds in the environment. Part II. Photodegradation and biodegradation. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 13, p.617-626, 2004.

DONALDSON, C. Feed the world. **Public Health**, v. 130, p.154-155, 2010.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred I Accuracy Assessment Genome Research, p.175-185, 2005.

FOSTER, R. K.; MCKERCHER, R. B. Laboratory incubation studies of chlorophenoxyacetic acids in chernozemic soils. **Soil Biology & Biochemistry** v.5, p.333-337, 1973.

GORDON, D. "Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed", in *Current Protocols in Bioinformatics*. A. D. Baxeavanis and D. B. Davison, eds. New York: John Wiley & Co., 11.2.1-11.2.43, 2004.

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.

GUELF, A.; AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J.; MOLINA, S. M. G. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **The Journal of General and Applied Microbiology** v.49, p.63-73, 2003.

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

HOLDEN, N.; PRITCHARD, L.; TOTH, I. Colonization outwith the colon: plant as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. **FEMS Microbiology Reviews** v.33, p.689-703, 2009.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Qualidade Ambiental: Produtos agrotóxicos comercializados**

no **Brasil/2009.** Disponível em: <
[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf)
 produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf,>, 2012.

IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review Biochemistry** v.77, p.755, 2008.

IŞIK, K., AYAR KAYALI, H., ŞAHİN, N., ÖZTÜRK GÜNDOĞDU, E., TARHAN, L. Antioxidant response of a novel *Streptomyces* sp. M3004 isolated from legume rhizosphere to H₂O₂ and paraquat. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 235-243, 2007.

IVANOVA, A.; MILLER, C.; GLINSKY, G.; ELSENSTARK, A. Role of *rpoS* (*katF*) in *oxyR*-independent regulation of hidropoxidase I in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, v.12, p.571-578, 1994.

JARDIM, J. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v.32, p.996-1012, 2009.

KEITH, K. E.; VALVANO, M. A. Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from *Burkholderia cenocepacia*. **Infection and Immunity** v.75, p.2451-2460, 2007.

KURENBACH, B.; MARJOSHI, D.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F.; FERGUSON, G. C.; GODSOE, W.; GIBSON, P.; HEINEMANN, J. A. Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides Dicamba, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, and Glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **American Society for Microbiology** v.6, 2015.

LEVY, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine** 10 (suppl 12), s. 122-129, 2004.

LI, Z., SHAO, T., MIN, H., LU, Z., & XU, X. Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac and the biodegradation of quinclorac. **Soil Biology and Biochemistry** v. 41, n. 5, p. 984-990, 2009.

LOEWEN, P. Probing the structure of catalase HP11 of *Escherichia coli* – a review. **Gene**, Amsterdam, v.179, p.39-44, 1996.

LUDWIG, W.; KLENK, H. P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics, In: GARRITY, G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second. ed., **Springer**, New York, 2001.

MA, R., KAUNDUN, S. S., TRANEL, P. J., RIGGINS, C. W., MCGINNESS, D. L., HAGER, A. G., HAWKES, T.; McINDOE, E.; RIECHERS, D. E. Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. **Plant Physiology**, v. 163, n. 1, p. 363-377, 2013.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, J.; SARAVANAN, V.; LEE, K.; SANTHANAKRISHNAN, P. *Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant growth-promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v.60, p.1559-1564, 2010.

MAHALINGAM, R.; FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signaling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum** v. 119, p. 56-68, 2003.

MARTINS, P. F.; MARTINEZ, C. O.; CARVALHO, G.; CARNEIRO, P. I. B.; AZEVEDO, R. A.; PILEGGI, S. A. V. et al. Selection of microorganisms degrading s-metachlor herbicide. *Brazilian Archives of Biology and Technology* v.50, p.153-159, 2007.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.525, p.145-160, 2012.

MOLINA-GONZÁLEZ, D.; ALONSO-CALLEJA, C.; ALONSO-HERNANDO, A.; CAPITA, R. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. **Food Control**, v.40, p.329-334, 2014.

MOLS, M; ABBE, T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus emi*. **Environmental Microbiology** v.13, p.1387-1394, 2011.

MONGKOLSUK, S.; DUBBS, J. M.; VATTANAVIBOON, P. Chemical modulation of physiological adaptation and cross-protective responses against oxidative stress in soil bacterium and phytopathogen *Xanthomonas*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v.32, p.687-690, 2005.

MUSARRAT, J.; BANO, N.; RAO, R.A.K. Isolation and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-catabolizing bacteria and their biodegradation efficiency in soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* v.16, p.495-497, 2000.

OLIVEIRA, J. R.; CONSTANTIN, R. S.; INOUE, J. M. H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. **Omnipax Editora**. Curitiba, 2011.

ONU, ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. *A ONU e a população mundial*, 2012.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L., SÁNCHEZ-SALINAS, E., DANTÁN-GONZÁLEZ, E., CASTREJÓN-GODÍNEZ, M. L. **Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process**, 2013.

PAAUW, A.; CASPERS, M.; SCHUREN, F.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M.; DELÉTOILE, A.; MONTIJN, R.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. **PLoS One** v.3, p.3018-3028, 2008.

PAZMIÑO, D. M.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; ARCHILLA-RUIZ, A.; DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. **Plant, Cell & Environment** v. 34(11), p. 1874-1879, 2011.

PERETTI, A.; DUFFARD, R.; EVANGELISTA DE DUFFARD, A. M. Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to *Rhizobium* sp. in pure culture. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** v.59, p.645-652, 1997.

POKORNY, R.; Some chlorophenoxyacetic acids. **Journal of the American Chemical Society** v.63, p.176, 1941.

PRIONE, L. P.; OLCANHESKI, R.; TULLIO, L. D.; SANTO, B.C E.; MARTINS, P. F.; CARVALHO, G.; ZIELINSKI, A. A. F.; DEMIATE, I. M.; PILEGGI, S. A. V.; DOURADO, M. N.; PRESTES, R. A.; SADOWSKY, M. J.; AZEVEDO, A. R.; PILEGGI, M. GST activity and membrane lipid saturation prevents mesotrione-induced damage in *Pantoea ananatis*. Em preparação, 2016.

ROBERTS, T. R.; HUTSON, D. H.; LEE, P. W.; NICHOLLS, P. H.; PLIMMER, J. R. Herbicides and plant growth regulators. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. **Metabolic pathways of agrochemical Part I** p.66-74, (Eds.) 1998.

RUIZ-LEAL, M., GEORGE, S. An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity. **Marine Environmental Research** v. 58, p.631–635, 2004.

SCHREINEMACHERS, P.; TIPRAQSA, P. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy**, v.37, p.616-626, 2012.

SHAO, T.; YUAN, H.; YAN, B.; LÜ, Z.; MIN, H. Antioxidant enzyme activity in bacterial resistance to nicotine toxicity by reactive oxygen species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** v.57, p.456-462, 2009.

SHARMA, D.; NAGPAL, A.; PAKADE, Y. B.; KATNORIA, J. K. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. **Talanta**, v. 82, p. 1077-1089, 2010.

SILVA, T. M.; STETS, M. I.; MAZZETTO, A. M.; ANDRADE, F. D.; PILEGGI, S. A. V.; FÁVERO, P. R.; CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P. I. B.; PILEGGI, M. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology** v.38, p.522-525, 2007.

SMITH, A. E.; AUBIN, A. J. Metabolites of [^{14}C]-2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Saskatchewan soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.39, p.2019-2021, 1991a.

SMITH, A. E.; AUBIN, A. J. Effects of long-term 2,4-D and MCPA field applications on the soil breakdown of 2,4-D, MCPA, mecoprop and 2,4,5-T. **Journal of Environmental Quality** v.20, p.436-438, 1991b.

TAGHAVI, S.; GARAFOLA, C.; MONCHY, S.; NEWMAN, L.; HOFFMAN, A. WEYENS, N. BARAC, T.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. **Applied and Environmental Microbiology** v.75, p.748, 2009.

TAN, L.; HU, Q.; XIONG, X.; SU, X.; HUANG, Y.; JIANG, Z.; ZHOU, Q.; ZHAO,

S.; ZENG, W. A. Isolation and characterization of a novel 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid-degrading *Enterobacter* sp. strain SE08. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v.96, p.198-204, 2013.

TRIGGS-RAINE, B.; DOBLE, B.W.; MULVEY, M.R.; SORBY, P.A.; LOEWEN, P.C. Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, 4415-4419, 1988.

VAN EERD, L. L.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C.; Pesticides metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, v.51, p.472-495, 2003.

VIEIRA, E. M.; PRADO, A. G.S.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. **Química Nova** v.22, p.305, 1999.

VOIE, O. A.; FONNUM, F. Effect of polychlorinated biphenyls on production of reactive oxygen species (ROS) in rat synaptosomes. **Archives of Toxicology**, v. 73, p. 588– 593, 2000.

WOOD, Z. A.; SCHRODER, E.; ROBBIN HARRIS, J.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences** v.28, p.32-40, 2003.

ZIMMERMAN, P. W.; HITCHCOK, E. A. Substituted phenoxy and benzoic acid growth substances and the relation of structure to physiological activity. **Contr. Boyce Thompson Inst** v.12, p.321-343, 1942.

5. Referências gerais

ABBOTT, S. L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas*, and other Enterobacteriaceae, In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JROGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, eighth ed., **ASM Press**, Washington, DC, p.684-700, 2003.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, L.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment** v.24, p.1337-1344, 2001.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R.; NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis. **Talanta** v.60, p.115-121, 2003.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA)**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Publicacao+Agrotoxico+Toxicologia/Sistema+de+Informacao+sobre+Agrotoxicos+SIA>>. Acesso em 12 jun. 2012.

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.

BALAGUÉ, C.; STÜRTZ, N.; DUFFARD, N.; DE DUFFARD, A. M. E. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical, composition, and cellular envelope. **John Wiley & Sons, Inc**, 2001.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova** v.29, p.113-123, 2006.

BARRIUSO, E.; HOUOT, S.; SIERRA-WITTLING, C. Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicides. **Pesticide Science** v.67, p.211-221, 1997.

BATISSON, I.; CROUZET, O.; BESSE-HOGGAN, P.; SANCELME, M.; MANGOT, J. F.; MALLET, C.; BOHATIER, J. Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. **Environmental Pollution** v.157, p.1195-1201, 2009.

BAKHOLDINA, S. I., KRASIKOVA, I. N., BUZOLEVA, L. S., SHUBIN, F. N., SOLOV'EVA, T. F. Effects of culture method and growth phase on free lipid composition of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 4, p. 415-421, 2001.

BATTISTONI, A. Role of prokaryotic Cu/Zn, superoxide dismutase in pathogenesis. **Biochemical Society Transactions** v.1, p.1326-1329, 2003.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improve assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry** v.44, p.276-287, 1971.

BENSALAH, N.; KHODARY, A.; WAHAB-ABDEL, A. Kinetic and mechanistic investigations of Mesotrione degradation in aqueous medium by Fenton process. **Journal of Hazardous Materials** v.189, p.479-485, 2011.

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

BRYNILDSEN, M. P.; WINKLER, J. A.; SPINA, C. S.; MACDONALD, I. C.; COLLINS, J. J. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. **Nature Biotechnology** v.31, p.160, 2013.

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

CAPITA, R.; RIESCO-PELÁEZ, F.; ALONSO-HERNANDO, A.; ALONSO-CALLEJA, C. Exposure of *Escherichia coli* ATCC12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance of antimicrobials, and ultrastructure. **Applied and Environmental Microbiology** v.80, p. 1268-1280, 2014.

CARMEL-HAREL, O.; STORZ, G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Review of Microbiology*, v.54, p.61-439, 2000.

CHAVES, A. C. O. Comportamento ambiental da ametrina e suas influências sobre a biodiversidade da comunidade microbiana dos solos. **Centro de Energia Nuclear na Agricultura**. Universidade de São Paulo 83p, 2007.

CHUKWUMA, S. E.; TAGBO, R.; ANIKE, E. N.; OJE, O. A.; ONWURAH, I. N. E. Biotechnological tools of environmental sustainability: Prospects and challenges for environments in Nigeria – A standard review. **Biotechnology Research International** v.2012, p.26, 2012.

COMEAU, Y.; GREER, C.; SAMSON, R. Role of inoculum preparation and density on the bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.38, p.681-687, 1993.

COTEUR, G.; DANIS, B.; FOWLER S. W.; TEYSSIE, J. L.; DUBOIS, P.; WARNAU, M. Effects of PCBs on reactive oxygen species (ROS) production by the immune cells of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). **Marine Pollution Bulletin** v. 42(8), p. 667-72, 2001.

DABROWSKA, D.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. The importance of degradation in the fate of selected organic compounds in the environment. Part II. Photodegradation and biodegradation. **Polish Journal of Environmental Studies** v.13, p.617-626, 2004.

DHARMARAJA, A. T.; CHAKRAPANI, H. A small molecule for controlled generation of reactive oxygen species (ROS). **Organic Letter** v.16 (2), p.398-401, 2014.

DING, N.; GUO, H.; HAYAT, T.; WU, Y.; XU, J. Microbial community structure changes during Aroclor 1242 degradation in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium multiflorum* L.). **FEMS Microbiology Ecolog** v.70, p.305-314, 2009.

ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred I Accuracy Assessment Genome Research, p.175-185, 2005.

EZRATY, B.; VERGNES, A.; BANZHAF, M.; DUVERGER, Y.; HUGUENOT, A.; BROCHADO, A. R.; SU, S. Y.; ESPINOSA, L.; LOISEAU, L.; PY, B.; TYPAS, A.; BARRAS, F. Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. **Science** v.340, p.1583, 2013.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Review Microbiology**, v.2, p.820-832, 2004.

FANG, F. C. Antibiotic and ROS linkage questioned. **Nature Biotechnology**. V.31, p. 415, 2013.

FOSTER, R. K.; McKERCHER, R. B. Laboratory incubation studies of chlorophenoxyacetic acids in chernozemic soils. **Soil Biology & Biochemistry** v.5, p.333-337, 1973.

FOTI, J. J.; DEVADOSS, B.; WINKLER, J. A.; COLLINS, J. J.; WALKER, G. C. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. **Science** v.336, p.315-319, 2012.

FRUMKIN, H. Agent orange and cancer: an overview for clinicians. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** v.53, n.4, p.245-255, 2003.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: Boon or bane? **Plant Biosystems** v.143, p.81-96, 2009.

GAVINI, F.; MERGAERT, J.; BEJI, A.; MIELCAREK, C.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck, 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov., **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.39, p.337-345, 1989.

GINTAUTAS, P. A.; DANIEL, S. R.; MACALADY, D. L. Phenoxyalkanoic acid herbicides in municipal landfill leachates. **Environ. Sci. Technol.** 26, 517-521, 1992.

GORDON, D. "Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed", in *Current Protocols in Bioinformatics*. A. D. Baxevanis and D. B. Davison, eds. New York: John Wiley & Co., 11.2.1-11.2.43, 2004.

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.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. The genus *Enterobacter*, In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Eds.), *The procaryotes*, second ed., **Springer**, New York, p.2797-2815, 1992.

GUELFÍ, A.; AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J.; MOLINA, S. M. G. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **The Journal of General and Applied Microbiology** v.49, p.63-73, 2003.

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

HEIPIEPER, H.J.; WEBER, F.J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; DE BONT, J.A.M. Mechanisms behind resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, v.12, p.409-415, 1994.

HOFFMANN, H.; STINDL, S.; LUDWIG, W.; STUMPF, A.; MEHLEN, A.; HEESEMANN, J.; MONGET, D.; SCHLEIFER, K.; ROGGENKAMP, A. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. **Systematic and Applied Microbiology** v.28, p.196-205, 2005.

HOLDEN, N.; PRITCHARD, L.; TOTH, I. Colonization outwith the colon: plant as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. **FEMS Microbiology Reviews** v.33, p.689-703, 2009.

HORMAECHE, E.; EDWARDS, P. R. A proposed genus *Enterobacter*, **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy** v.10, p.71-74, 1960.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Qualidade Ambiental: Produtos agrotóxicos comercializados**

no **Brasil/2009.** Disponível em: <
[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf)
 produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf,>, 2012.

IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review Biochemistry** v.77, p.755, 2008.

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

IŞIK, K., AYAR KAYALI, H., ŞAHİN, N., ÖZTÜRK GÜNDOĞDU, E., TARHAN, L. Antioxidant response of a novel *Streptomyces* sp. M3004 isolated from legume rhizosphere to H₂O₂ and paraquat. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 235-243, 2007.

IVANOVA, A.; MILLER, C.; GLINSKY, G.; ELSENSTARK, A. Role of *rpoS* (*katF*) in *oxyR*-independent regulation of hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, v.12, p.571-578, 1994.

JARDIM, J. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global- um enfoque às maçãs. **Química Nova** v.32, p.996-1012, 2009.

JUNIOR, A. M.; GLIIDLIN, A. F.; ALMEIDA, M. L.; HAVERROTH, H. S. Aumento da população de plantas e uso de herbicidas no controle de plantas daninhas em milho. **Planta daninha** v. 15, 1997.

KAMRIN, M. A. Pesticide profiles – toxicity, environmental impact and fate. **CRC Press LLC**: Michigan, 1997.

KEITH, K. E.; VALVANO, M. A. Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from *Burkholderia cenocepacia*. **Infection and Immunity** v.75, p.2451-2460, 2007.

KEREN, I.; WU, Y.; INOCENCIO, J.; MULCAHY, I. R.; LEWIS, K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. **Science** v.339, p.1213, 2013.

KONDA, L. N.; PASZTOR, Z. Environmental distribution of acetochlor, atrazine, chlorpyrifos and propisochlor under field conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.49, p.3859-3863, 2001.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C. A.; COLLINS, J. J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell** v. 130, p.797-810, 2007.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D.; Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods** v.43, p.197-212, 2001.

KRAYL, M.; BENNDORF, D.; LOFFHAGEN, N.; BABEL, W. Use of proteomics and physiological characteristics to elucidate ecotoxic effects of methyl tert-butyl ether in *Pseudomonas putida* KT2440. **Proteomics**, v.3, p.1544-1552, 2003.

KURENBACH, B.; MARJOSHI, D.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F.; FERGUSON, G. C.; GODSOE, W.; GIBSON, P.; HEINEMANN, J. A. Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides Dicamba, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, and Glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **American Society for Microbiology** v.6, 2015.

LEE, K.; JOHNSON, V.; BLAKLEY, B. The effect of exposure to a commercial 2,4-D formulation during gestation on the immune response in CD-1 mice. **Toxicology** v.165, p.39-49, 2001.

LERCH, T. Z.; DIGNAC, M-F.; NUNAN, N.; BARDOUX, G.; BARRIUSO, E.; MARIOTTI, A. Dynamics of soil microbial populations involved in 2,4-D

biodegradation revealed by FAME-based stable isotope probing. **Soil Biology & Chemistry** v.41, p.77-85, 2009.

LEVY, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine** 10 (suppl 12), s. 122-129, 2004.

LI, Z., SHAO, T., MIN, H., LU, Z., & XU, X. Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac and the biodegradation of quinclorac. **Soil Biology and Biochemistry** v. 41, n. 5, p. 984-990, 2009.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science** v.37, p.293-303, 2001.

LINDH, E.; KJAELDGAARD, P.; FREDERIKSEN, W.; URSING, J. Phenotypical properties of *Enterobacter agglomerans* (*Pantoea agglomerans*) from human, animal and plants sources. **APMIS** v.99, p.347-352, 1991.

LIN, X., XU, X., YANG, C., ZHAO, Y., FENG, Z., DONG, Y. Activities of antioxidant enzymes in three bacteria exposed to bensulfuron-methyl. **Ecotoxicology and environmental safety** v. 72, n. 7, p.1899-1904, 2009.

LIU, W.; LI, H.; TAO, F.; LI, S.; TIAN, Z. XIE, H. Formation and contamination of PCDD/Fs, PCBs, PeCBz, HxCBz and polychlorophenols in the production of 2,4-D products. **Chemosphere** v.92, p.304-308, 2013.

LIU, Y.; IMLAY, J. A. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. **Science** v.339, p.1210, 2013.

LOEWEN, P. Probing the structure of catalase HP11 of *Escherichia coli* – a review. **Gene**, Amsterdam, v.179, p.39-44, 1996.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. **Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa**, Rio de Janeiro, 2011.

LUDWIG, W.; KLENK, H. P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics, In: GARRITY, G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second. ed., **Springer**, New York, 2001.

MA, R., KAUNDUN, S. S., TRANEL, P. J., RIGGINS, C. W., MCGINNESS, D. L., HAGER, A. G., HAWKES, T.; McINDOE, E.; RIECHERS, D. E. Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. **Plant Physiology**, v. 163, n. 1, p. 363-377, 2013.

MABURY, S. A.; CROSBY, D. G. The relationship of hydroxyl reactivity to pesticide persistence. In: Raton B, editor. *Aquatic and surface photochemistry*. **CRC Press, Lewis Publishers** p.61-149, 1994.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, J.; SARAVANAN, V.; LEE, K.; SANTHANAKRISHNAN, P. *Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant growth-promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v.60, p.1559-1564, 2010.

MAHALINGAM, R.; FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signaling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum** v. 119, p. 56-68, 2003.

MALSTRON, B.; ANDREASSON, L.; REINHAMMAER, B. In: **Boyer, P. (Ed) In the enzymes, v. XIIB**, p.533, 1975.

MATES, L. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Biogenic amines** v.153, p.83-104, 2000.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.525, p.145-160, 2012.

MOLINA-GONZÁLEZ, D.; ALONSO-CALLEJA, C.; ALONSO-HERNANDO, A.; CAPITA, R. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. **Food Control**, v.40, p.329-334, 2014.

MOLS, M; ABBE, T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus emi*. **Environmental Microbiology** v.13, p.1387-1394, 2011.

MONGKOLSUK, S.; DUBBS, J. M.; VATTANAVIBOON, P. Chemical modulation of physiological adaptation and cross-protective responses against oxidative stress in soil bacterium and phytopathogen *Xanthomonas*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v.32, p.687-690, 2005.

MUSARRAT, J.; BANO, N.; RAO, R.A.K. Isolation and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-catabolizing bacteria and their biodegradation efficiency in soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* v.16, p.495-497, 2000.

NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M. M. Degradação e formação de resíduos não-extraíveis ou ligados do herbicida atrazina em solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.35, p.1509-1515, 2000.

NYUK-MIN, C.; JUNG-CHENG, H. Production of xenobiotic degrader for potential application in bioaugmentation. **Bioresource Technology** v.125, p.305-311, 2012.

NUNES, C.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; VINAS, I. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. **International Journal of Food Microbiology** v.70, p.53-61, 2001.

OLCHANHESKI, L. R., DOURADO, M. N., BELTRAME, F. L., ZIELINSKI, A. A., DEMIATE, I. M., PILEGGI, S. A., 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, 2014.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L., SÁNCHEZ-SALINAS, E., DANTÁN-GONZÁLEZ, E., CASTREJÓN-GODÍNEZ, M. L. **Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process**, 2013.

PAAUW, A.; CASPERS, M.; SCHUREN, F.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M.; DELÉTOILE, A.; MONTIJN, R.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. **PLoS One** v.3, p.3018-3028, 2008.

PAYRAUDEAU, S.; GREGOIRE, C. Modelling pesticides transfer to surface water at the catchment scale: a multi-criteria analysis. **Agronomy for Sustainable Development** p.32, 479-500, 2012.

PAZMIÑO, D. M.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; ARCHILLA-RUIZ, A.; DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. **Plant, Cell & Environment** v. 34(11), p. 1874-1879, 2011.

PENNY, C.; VUILLEUMIER, S.; BRINGEL, F. Microbial degradation of tetrachlorometane: mechanisms and perspective for bioremediation. **FEMS Microbiology Ecology** v.74, p.257-275, 2010.

PERETTI, A.; DUFFARD, R.; EVANGELISTA DE DUFFARD, A. M. Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to *Rhizobium* sp. in pure culture. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** v.59, p.645-652, 1997.

PERNAK, J.; SYGUDA, A.; MATERNA, K.; JANUS, E.; KARDASZ, P.; PRACZYK, T. 2,4-D based herbicidal ionic liquids. **Tetrahedron** v.68, p.4267-4273, 2012.

PETERSEN, S.O.; KLUG, M.J. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2421-2430, 1994.

PICHAT, J.; D'OLIVEIRA, J. C.; MAFFRE, J. F.; MAS, D. Destruction of 2,4-D in water by TiO₂-UV, H₂O₂-UV, or direct photolysis. In: Ollis, D. F., Al-Ekabi, H. (Eds.), Photocatalytic Purification and Treatment of Water and Air. **Elsevier**, Amsterdam, p.683-687, 1993.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. Herbicides behavior in soil: influence of organic matter. **Revista Biociência** v.6, p.17-22, 2000.

PRIONE, L. P.; OLCANHESKI, R.; TULLIO, L. D.; SANTO, B.C E.; MARTINS, P. F.; CARVALHO, G.; ZIELINSKI, A. A. F.; DEMIATE, I. M.; PILEGGI, S. A. V.; DOURADO, M. N.; PRESTES, R. A.; SADOWSKY, M. J.; AZEVEDO, A. R.; PILEGGI, M. GST activity and membrane lipid saturation prevents mesotrione-induced damage in *Pantoea ananatis*. Em preparação, 2016.

QUENSEN III, J. F.; MUELLER, S. A.; JAIN, M. K.; TIEDJE, J. M. Reductive dechlorination of DDE to DDMU in marine sediment microcosms. **Science** 280, 722-724, 1998.

RYAN, K. C.; JOHNSON, O. E.; CABELLI, D. E.; BRUNOLD, T. C.; MARONEY, M. J. Nickel superoxide dismutase: structural and function roles of Cys2 and Cys6. **Journal of Biological Inorganic Chemistry** v.15, p.795-807, 2010.

ROBERTS, T. R.; HUTSON, D. H.; LEE, P. W.; NICHOLLS, P. H.; PLIMMER, J. R. Herbicides and plant growth regulators. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. **Metabolic pathways of agrochemical Part I** p.66-74, (Eds.) 1998.

RUIZ-LEAL, M., GEORGE, S. An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity. **Marine Environmental Research** v. 58, p.631–635, 2004.

SBANO, A.; FERREIRA, J. V. R.; PECKLE, B. A.; MACRAE, A.; DIREITO, I. C. N. Otimização do método cromatográfico para quantificação do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Acta Scientiae & Technicae** v.1, n.2, p.37-46, 2013.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.38, p.995-1014, 2005.

SCHNOOR, J. L. Fate of pesticides and chemicals in the environment. **Wiley-Interscience**, New York, 1991.

SHAO, T.; YUAN, H.; YAN, B.; LÜ, Z.; MIN, H. Antioxidant enzyme activity in bacterial resistance to nicotine toxicity by reactive oxygen species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** v.57, p.456-462, 2009.

SHARMA, D.; NAGPAL, A.; PAKADE, Y. B.; KATNORIA, J. K. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta* v.82, p. 1077-1089, 2010.

SHOEBITZ, M.; RIBAUDO, C.; PARDO, M.; CANTORE, M.; CIAMPI, L.; CURÁ, J. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry** v.41, p.1768-1774, 2009.

SILVA, T. M.; STETS, M. I.; MAZZETTO, A. M.; ANDRADE, F. D.; PILEGGI, S. A. V.; FÁVERO, P. R.; CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P. I. B.; PILEGGI, M. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology** v.38, p.522-525, 2007.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Applied and Environmental Microbiology** v.77, n.4, p.153-1161, 2011.

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, P. H. A.. Sneath, approved lists of bacterial names, **Int. J. Syst. Bacteriol** v.30, p.225-420, 1980.

SMITH, A. E.; AUBIN, A. J. Metabolites of [^{14}C]-2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Saskatchewan soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.39, p.2019-2021, 1991a.

SMITH, A. E.; AUBIN, A. J. Effects of long-term 2,4-D and MCPA field applications on the soil breakdown of 2,4-D, MCPA, mecoprop and 2,4,5-T. **Journal of Environmental Quality** v.20, p.436-438, 1991b.

STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C.P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciências Saúde Coletiva** 10, 91-100, 2005.

TAGHAVI, S.; GARAFOLA, C.; MONCHY, S.; NEWMAN, L.; HOFFMAN, A. WEYENS, N. BARAC, T.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. **Applied and Environmental Microbiology** v.75, p.748, 2009.

TAN, L.; HU, Q.; XIONG, X.; SU, X.; HUANG, Y.; JIANG, Z.; ZHOU, Q.; ZHAO, S.; ZENG, W. A. Isolation and characterization of a novel 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid-degrading *Enterobacter* sp. strain SE08. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v.96, p.198-204, 2013.

TOMLIN, C. D. S.; **The Pesticide Manual, A World Compendium**, 15th Ed. British Crop Protection Council: Alton, Hampshire, 2009.

TRIGGS-RAINE, B.; DOBLE, B.W.; MULVEY, M.R.; SORBY, P.A.; LOEWEN, P.C. Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, 4415-4419, 1988.

TURUSOV, V.; RAKITSK, V.; TOMATIS, L. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, persistence and risk. **Environmental Health Perspective** 110, 125-128, 2002.

VAN DER LINDEN, A. M. A.; TIKTAK, A.; BOESTEN, J. J. T. I.; LEIJNSE, A. Influence of pH-dependent sorption and transformation on simulated pesticide leaching. **Sci Total Environ** v.407, p.3415-3420, 2009.

VAN EERD, L. L.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticides metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science** v. 51, p. 472-495, 2003.

VERCRAENE-EAIRMAL, M.; LAUGA, B.; SAINT, S. L.; MAZZELLA, N.; BOUTRY, S.; SIMON, M.; KARAMA, S.; DELMAS, F.; DURAN, R. Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. **Chemosphere**, v.81, p. 837-843, 2010.

VIEIRA, E. M.; PRADO, A. G.S.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. **Química Nova** v.22, p.305, 1999.

VOIE, O. A.; FONNUM, F. Effect of polychlorinated biphenyls on production of reactive oxygen species (ROS) in rat synaptosomes. **Archives of Toxicology**, v. 73, p. 588– 593, 2000.

VÖRÖSMARTY, C. J.; MCINTYRE, P. B.; GESSNER, M. O.; DUDGEON, D.; PRUSEVICH, A.; GREEN, P. ET AL. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature** v.467, p.555-561, 2010.

WANG, X.; ZHAO, X. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.53, p.1395-1402, 2009.

WITTMER, I. K.; BADER, H. P.; SCHEIDEGGER, R.; SINGER, H.; LNCK, A.; HANKE, I.; CARLSSON, C.; STAMM, C. Significance of urban and agricultural

land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. **Water Res** v.44, p.2850-2862, 2010.

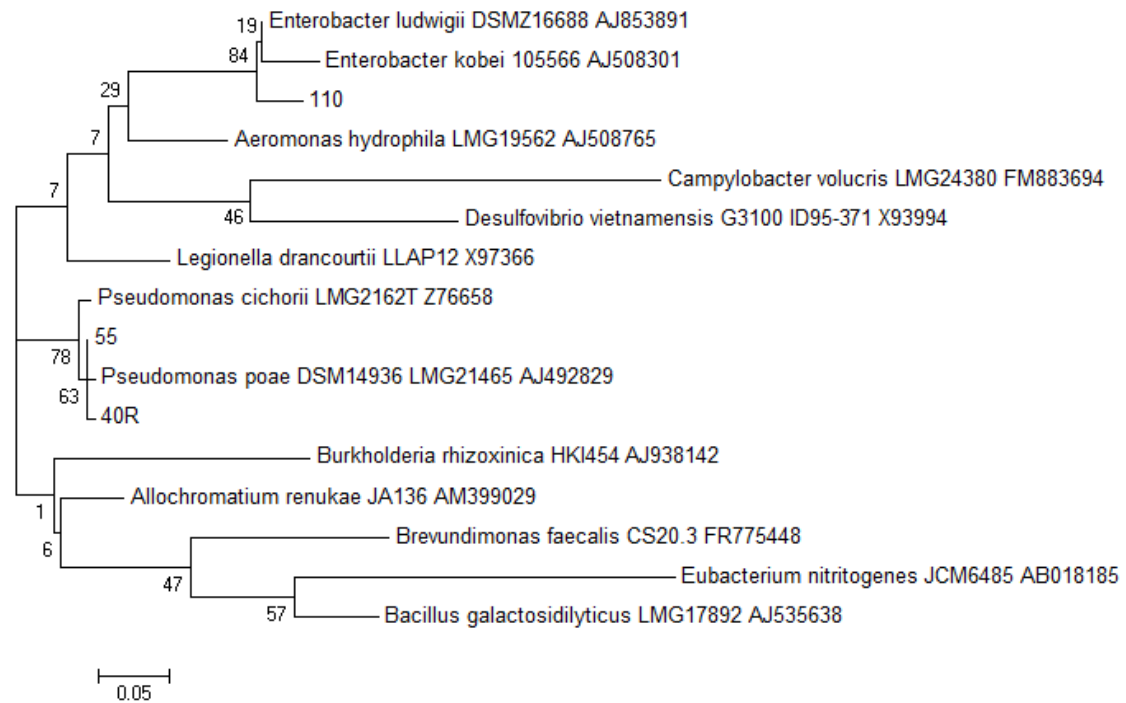
WOOD, Z. A.; SCHRODER, E.; ROBBIN HARRIS, J.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences** v.28, p.32-40, 2003.

WORTHING, C. R.; HANCE, R. J. The pesticide manual – A world compendium. **The British Crop Protection Council**, Farnham, UK, 1991.

ZIMMERMAN, P. W.; HITCHCOK, E. A. Substituted phenoxy and benzoic acid growth substances and the relation of structure to physiological activity. **Contr. Boyce Thompson Inst** v.12, p.321-343, 1942.

6. Anexos

Identificação da linhagem por meio do gene 16S rRNA



Análises Estatísticas

Capítulo 1 – Crescimento bacteriano

Seção 1.1 - cresc10h concl0h, bonferroni means st

c0ntr=0 x 1 | Summary of medias

x 10 | Mean Std. Dev.

-----+-----

0 | .44649999 .04737616

1 | .3865 .00212134

10 | .2025 .00494975

-----+-----

Total | .34516666 .11570206

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F
--------	----	----	----	---

Prob > F

Between groups	.064661328	2	.032330664	42.66
----------------	------------	---	------------	-------

0.0063

Within groups	.0022735	3	.000757833	
---------------	----------	---	------------	--

Total	.066934829	5	.013386966	
-------	------------	---	------------	--

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 5.1732
 Prob>chi2 = 0.075

Comparison of medias by c0ntr=0 x 1 x 10

(Bonferroni)

Row Mean-

Col Mean	0	1
----------	---	---

-----+-----

1	-.06	
---	------	--

		0.352	
10		-.244	-.184
		0.009	0.020

Seção 1.2 - cresc15h concentr, bonferroni means st

c0ntr=0 x 1 | Summary of medias

x 10		Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		.884	.11313706
1		1.015	.10323765
10		.37799999	.00282843
-----+-----			
Total		.759	.30858063

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F

Between groups	.452644031	2	.226322015	28.93
Within groups	.023466007	3	.007822002	

Total	.476110038	5	.095222008	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 4.2116
 Prob>chi2 = 0.122

Comparison of medias by c0ntr=0 x 1 x 10

(Bonferroni)

Row Mean-|

Col Mean		0	1
----------	--	---	---

```

-----+-----
      1 |      .131
        |      0.705
        |
     10 |     -.506     -.637
        |      0.032     0.017

```

Seção 1.3 - cresc20h concentr, bonferroni means st

```

c0ntr=0 x 1 |      Summary of medias
      x 10 |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
      0 |    2.3735001   .20011121
      1 |    2.8824999   .04596198
     10 |    .98100001   .0014142
-----+-----
    Total |        2.079   .8852177

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups        3.87589289      2    1.93794644    137.90
0.0011
Within groups         .042159002      3    .014053001
-----
Total                 3.91805189      5    .783610378
-----

```

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 6.7190
Prob>chi2 = 0.035

Comparison of medias by c0ntr=0 x 1 x 10
(Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |          0          1
-----+-----
      1 |      .509
        |      0.070
        |
     10 |     -1.3925    -1.9015
        |      0.004      0.002

```

Seção 1.4 - cresc25h concentr, bonferroni means st

```

c0ntr=0 x 1 |      Summary of medias
      x 10 |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
      0 |      3.1875   .32880476
      1 |      3.216    .20364666
     10 |      1.896    .01131373
-----+-----
    Total |      2.7665   .69625216

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups      2.27412283      2    1.13706142    22.78
0.0154
Within groups       .149712534      3    .049904178
-----
Total               2.42383537      5    .484767073
-----

```

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 3.7231$
 Prob> $\chi^2 = 0.155$

Comparison of medias by c0ntr=0 x 1 x 10
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	0	1
-----+-----		
1	.0285	
	1.000	
10	-1.2915	-1.32
	0.031	0.029

Seção 1.5 - cresc29h concentr, bonferroni means st

c0ntr=0 x 1	Summary of medias	
x 10	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
0	3.8774999	.68942888
1	3.609	.19091882
10	2.4625	.22273851
-----+-----		
Total	3.3163333	.75107401

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	2.25918624	2	1.12959312	6.04
0.0888				
Within groups	.561374612	3	.187124871	

Total	2.82056085	5	.56411217	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 1.4062$
 Prob> $\chi^2 = 0.495$

Comparison of medias by c0ntr=0 x 1 x 10

(Bonferroni)

Row Mean-

Col Mean | 0 1

-----+-----

1 | -.2685

 | 1.000

 |

10 | -1.415 -1.1465

 | 0.140 0.231

Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

concentr	_Obs	_RankSum
----------	------	----------

0	2	9.00
---	---	------

1	2	9.00
---	---	------

10	2	3.00
----	---	------

chi-squared = 3.429 with 2 d.f.

probability = 0.1801

chi-squared with ties = 3.429 with 2 d.f.

probability = 0.1801

Capítulo 2 – Viabilidade Celular

Seção 2.1- vial5h conc, bonferroni means st

Summary of medias		
0=contr x 1	Mean	Std. Dev.
x 10		
-----+-----		
0	2348.6667	404.11673
1	655	17.320508
10	16405.333	594.66069
-----+-----		
Total	6469.6667	7496.3812

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	448531385	2	224265692	1300.77
0.0000				
Within groups	1034463.33	6	172410.556	

Total	449565848	8	56195731.0	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 9.3105

Prob>chi2 = 0.010

Comparison of medias by 0=contr x 1 x 10
(Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	0 1
-----+-----	
1	-1693.67
	0.007

10		14056.7	15750.3
		0.000	0.000

```
via15h, by ( conc)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

conc	_Obs	_RankSum
0	3	15.00
1	3	6.00
10	3	24.00

```
chi-squared =      7.200 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0273
```

```
chi-squared with ties =      7.261 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0265
```

Seção 2.2 - via20h conc, bonferroni means st

```

0=contr x 1 |      Summary of medias
          x 10 |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
          0 |    826.66667    378.06525
          1 |    606.33333    96.666092
          10 |    73.666667   19.629909
-----+-----
        Total |    502.22222   388.04245

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups        899289.556         2    449644.778     8.84
0.0163
Within groups         305326.00         6     50887.6667
-----
Total                 1204615.56         8    150576.944
-----

```

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 9.0742$
Prob> $\chi^2 = 0.011$

Comparison of medias by 0=contr x 1 x 10
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |          0          1
-----+-----
          1 |    -220.333
          |          0.830

```

10		-753	-532.667
		0.019	0.083

via20h, by (conc)

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

conc	_Obs	_RankSum
0	3	21.00
1	3	18.00
10	3	6.00

chi-squared = 5.600 with 2 d.f.

probability = 0.0608

chi-squared with ties = 5.647 with 2 d.f.

probability = 0.0594

via20h, by (conc)

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

conc	_Obs	_RankSum
0	3	15.00
10	3	6.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.971 with 1 d.f.

probability = 0.0463

```
via20h, by ( conc)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

conc	_Obs	_RankSum
1	3	15.00
10	3	6.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.971 with 1 d.f.

probability = 0.0463

Seção 2.3 - via25h conc, bonferroni means st

```

0=contr x 1 |      Summary of medias
          x 10 |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
          0 |      3600   2468.1724
          1 |  164.33333   54.647354
         10 |      2576   3173.6112
-----+-----
        Total |  2113.4444   2524.9222

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups      18668517.6         2   9334258.78    1.73
0.2548
Within groups      32333338.7         6   5388889.78
-----
Total              51001856.2         8   6375232.03
-----

```

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 11.0455$
Prob>chi2 = 0.004

Comparison of medias by 0=contr x 1 x 10
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      0      1
-----+-----
      1 |  -3435.67
        |      0.360
        |

```

10		-1024	2411.67
		1.000	0.751

via25h, by (conc)

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

conc	_Obs	_RankSum
0	3	22.00
1	3	6.00
10	3	17.00

chi-squared = 5.956 with 2 d.f.

probability = 0.0509

chi-squared with ties = 5.956 with 2 d.f.

probability = 0.0509

via25h, by (conc)

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

conc	_Obs	_RankSum
0	3	15.00
1	3	6.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

via25h, by (conc)

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

conc	_Obs	_RankSum
1	3	6.00
10	3	15.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

via25h, by (conc)

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

conc	_Obs	_RankSum
0	3	13.00
10	3	8.00

chi-squared = 1.190 with 1 d.f.

probability = 0.2752

chi-squared with ties = 1.190 with 1 d.f.

probability = 0.2752

Seção 2.4 - via0 horas, bonferroni means st

Summary of medias		
15 h x 20h	Mean	Std. Dev.
x 25h		
-----+-----		
15	2348.6667	404.11673
20	826.66667	378.06525
25	3600	2468.1724
-----+-----		
Total	2258.4444	1745.3486

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	11573696.9	2	5786848.44	2.71
0.1448				
Within groups	12796237.3	6	2132706.22	

Total	24369934.2	8	3046241.78	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 6.9099$
 Prob> $\chi^2 = 0.032$

Comparison of medias by 15 h x 20h x 25h
 (Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	
-----+-----	
20	-1522
	0.747

25		1251.33	2773.33
		1.000	0.177

```
via0, by ( horas)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

horas	_Obs	_RankSum
15	3	18.00
20	3	6.00
25	3	21.00

```
chi-squared =      5.600 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0608
```

```
chi-squared with ties =      5.600 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0608
```

```
.
```

Seção 2.5 - vialx horas, bonferroni means st

15 h x 20h		Summary of medias	
x 25h		Mean	Std. Dev.
-----+-----			
15		655	17.320508
20	606.33333		96.666092
25	164.33333		54.647354
-----+-----			
Total	475.22222		240.76637

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	438486.222	2	219243.111	52.07
0.0002				
Within groups	25261.3333	6	4210.22222	

Total	463747.556	8	57968.4444	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 3.5799$
 Prob> $\chi^2 = 0.167$

Comparison of medias by 15 h x 20h x 25h

(Bonferroni) Row Mean-

Col Mean	15	20
-----+-----		
20	-48.6667	
	1.000	
25	-490.667	-442
	0.000	0.000

Seção 2.6 - via10x horas, bonferroni means st

15 h x 20h		Summary of medias	
x 25h		Mean	Std. Dev.
-----+-----			
15		16405.333	594.66069
20		73.666667	19.629909
25		2576	3173.6112
-----+-----			
Total		6351.6667	7786.9049

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	464235469	2	232117734	66.79
0.0001				
Within groups	20851629.3	6	3475271.56	

Total	485087098	8	60635887.3	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 16.9007$
 Prob> $\chi^2 = 0.000$

Comparison of medias by 15 h x 20h x 25h
 (Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	15	20
-----+-----		
20	-16331.7	
	0.000	

```

25 |    -13829.3    2502.33
    |         0.000    0.454

```

```
via10x, by ( horas)
```

```
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
```

horas	_Obs	_RankSum
15	3	24.00
20	3	6.00
25	3	15.00

```
chi-squared =      7.200 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0273
```

```
chi-squared with ties =      7.261 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0265
```

```
.
```

Seção 2.7 - via015hx1 con15hxcc1, bonferroni means st

0.15h x		
1.20h x	Summary of medias	
1.25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.15	2348.6667	404.11673
1.2	606.33333	96.666092
1.25	164.33333	54.647354
-----+-----		
Total	1039.7778	1021.8662

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	8002401.56	2	4001200.78	68.34
0.0001				
Within groups	351282.00	6	58547.00	

Total	8353683.56	8	1044210.44	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 6.1937
 Prob>chi2 = 0.045

Comparison of medias by 0.15h x 1.20h x 1.25h
 (Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	.15	1.2	
-----+-----			
1.2	-1742.33		
		0.000	

1.25		-2184.33	-442
		0.000	0.200

```
via015hx1, by ( con15hxcc1)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con15hx~1	_Obs	_RankSum
.15	3	24.00
1.2	3	15.00
1.25	3	6.00

chi-squared = 7.200 with 2 d.f.

probability = 0.0273

chi-squared with ties = 7.200 with 2 d.f.

probability = 0.0273

Seção 2.8 - via020hx1 con20hx1, bonferroni means st

```

1.15 x .2 x |      Summary of medias
          1.25 |      Mean      Std. Dev.
-----+-----
          .2 |      826.66667    378.06525
          1.15 |           655    17.320508
          1.25 |      164.33333    54.647354
-----+-----
          Total |      548.66667    353.79161

```

```

                                Analysis of Variance
Source                          SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups      708908.667         2    354454.333      7.27
0.0249
Within groups      292439.333         6     48739.8889
-----
Total              1001348.00         8     125168.50
-----

```

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 11.1388
Prob>chi2 = 0.004

Comparison of medias by 1.15 x .2 x 1.25
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      .2      1.15
-----+-----
          1.15 |     -171.667
              |           1.000
              |

```

```

1.25 |    -662.333    -490.667
      |         0.031         0.104

```

```
via020hx1, by( con20hx1)
```

```
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
```

con20hx1	_Obs	_RankSum
.2	3	21.00
1.15	3	18.00
1.25	3	6.00

```
chi-squared =      5.600 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0608
```

```
chi-squared with ties =      5.647 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0594
```

```
via020hx1, by( con20hx1)
```

```
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
```

con20hx1	_Obs	_RankSum
.2	3	15.00
1.25	3	6.00

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

```
probability =      0.0495
```

```
chi-squared with ties =      3.857 with 1 d.f.
```

```
probability =      0.0495
```



```
via020hx1, by( con20hx1)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con20hx1	_Obs	_RankSum
1.15	3	15.00
1.25	3	6.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.971 with 1 d.f.

probability = 0.0463

```
via020hx1, by( con20hx1)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con20hx1	_Obs	_RankSum
.2	3	12.00
1.15	3	9.00

chi-squared = 0.429 with 1 d.f.

probability = 0.5127

chi-squared with ties = 0.441 with 1 d.f.

probability = 0.5066

Seção 2.9 - via025hx1 con25hx1, bonferroni means st

Summary of medias		
	Mean	Std. Dev.
1.15 x 1.20		
x 0.25		
.25	3600	2468.1724
1.15	655	17.320508
1.2	606.33333	96.666092
Total	1620.4444	1931.3361

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Between groups	17637433.6	2	8818716.78	4.34
Within groups	12203038.7	6	2033839.78	
Total	29840472.2	8	3730059.03	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 21.4487$
 Prob> $\chi^2 = 0.000$

Comparison of medias by 1.15 x 1.20 x 0.25
 (Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	
.25	1.15
1.15	-2945
	0.134

```

1.2 |    -2993.67    -48.6667
    |         0.127      1.000

```

```
via025hx1, by( con25hx1)
```

```
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
```

con25hx1	_Obs	_RankSum
.25	3	24.00
1.15	3	12.00
1.2	3	9.00

```
chi-squared =      5.600 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0608
```

```
chi-squared with ties =      5.647 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0594
```

```
via025hx1, by( con25hx1)
```

```
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
```

con25hx1	_Obs	_RankSum
.25	3	15.00
1.2	3	6.00

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

```
probability =      0.0495
```

```
chi-squared with ties =      3.857 with 1 d.f.
```

```
probability =      0.0495
```

```
via025hx1, by( con25hx1)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con25hx1	_Obs	_RankSum
.25	3	15.00
1.15	3	6.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.971 with 1 d.f.

probability = 0.0463

Seção 2.10 - via015hx10 con15hxc10, bonferroni means st

0.15h x		
10.20h x	Summary of medias	
10.25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.15	2348.6667	404.11673
10.2	73.666667	19.629909
10.25	2576	3173.6112
-----+-----		
Total	1666.1111	1998.7491

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	11488977.6	2	5744488.78	1.68
0.2628				
Within groups	20471007.3	6	3411834.56	

Total	31959984.9	8	3994998.11	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 18.0745$
 Prob> $\chi^2 = 0.000$

Comparison of medias by 0.15h x 10.20h x 10.25h
 (Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	.15	10.2
-----+-----		
10.2	-2275	
	0.547	

10.25		227.333	2502.33
		1.000	0.444

```
via015hx10, by( con15hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con15h~10	_Obs	_RankSum
.15	3	21.00
10.2	3	6.00
10.25	3	18.00

```
chi-squared =      5.600 with 2 d.f.
probability =      0.0608
```

```
chi-squared with ties =      5.647 with 2 d.f.
probability =      0.0594
```

```
via015hx10, by( con15hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con15h~10	_Obs	_RankSum
.15	3	15.00
10.2	3	6.00

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

```
chi-squared with ties =      3.971 with 1 d.f.
probability =      0.0463
```

```
via015hx10, by( con15hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con15h~10	_Obs	_RankSum
10.2	3	6.00
10.25	3	15.00

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

```
chi-squared with ties =      3.971 with 1 d.f.
probability =      0.0463
```

Seção 2.11 - via020hx10 con20hxc10, bonferroni means st

10.15h x		
0.20h x	Summary of medias	
10.25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.2	826.66667	378.06525
10.15	16405.333	594.66069
10.25	2576	3173.6112
-----+-----		
Total	6602.6667	7567.5476

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	437005483	2	218502741	62.03
0.0001				
Within groups	21136725.3	6	3522787.56	

Total	458142208	8	57267776.0	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 7.2866
 Prob>chi2 = 0.026

Comparison of medias by 10.15h x 0.20h x 10.25h

(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	.2	10.15	
-----+-----			
10.15	15578.7		
	0.000		


```

10.25 |      1749.33   -13829.3
      |           0.891     0.000

```

```
. kwallis via020hx10, by( con20hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con20h~10	_Obs	_RankSum
.2	3	10.00
10.15	3	24.00
10.25	3	11.00

chi-squared = 5.422 with 2 d.f.

probability = 0.0665

chi-squared with ties = 5.422 with 2 d.f.

probability = 0.0665

```
via020hx10, by( con20hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con20h~10	_Obs	_RankSum
.2	3	6.00
10.15	3	15.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

```
via020hx10, by( con20hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con20h~10	_Obs	_RankSum
10.15	3	15.00
10.25	3	6.00

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

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

```
via020hx10, by( con20hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con20h~10	_Obs	_RankSum
.2	3	10.00
10.25	3	11.00

```
chi-squared =      0.048 with 1 d.f.
probability =      0.8273
```

```
chi-squared with ties =      0.048 with 1 d.f.
probability =      0.8273
```

Seção 2.12 - via025hx10 con25hxc10, bonferroni means st

10.15h x		
10.20 h x	Summary of medias	
0.25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.25	3600	2468.1724
10.15	16405.333	594.66069
10.2	73.666667	19.629909
-----+-----		
Total	6693	7550.0554

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	443134925	2	221567462	103.12
0.0000				
Within groups	12891763.3	6	2148627.22	

Total	456026688	8	57003336.0	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 15.3629
 Prob>chi2 = 0.000

Comparison of medias by 10.15h x 10.20 h x 0.25h
 (Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	.25	10.15	
-----+-----			
10.15	12805.3		
	0.000		

```

10.2 |    -3526.33    -16331.7
      |           0.077      0.000

```

```
via025hx10, by( con25hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con25h~10	_Obs	_RankSum
.25	3	15.00
10.15	3	24.00
10.2	3	6.00

```
chi-squared =      7.200 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0273
```

```
chi-squared with ties =      7.261 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0265
```

```
via025hx10, by( con25hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con25h~10	_Obs	_RankSum
.25	3	6.00
10.15	3	15.00

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

```
probability =      0.0495
```

```
chi-squared with ties =      3.857 with 1 d.f.
```

```
probability =      0.0495
```

```
via025hx10, by( con25hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con25h~10	_Obs	_RankSum
.25	3	15.00
10.2	3	6.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.971 with 1 d.f.

probability = 0.0463

```
via025hx10, by( con25hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

con25h~10	_Obs	_RankSum
10.15	3	15.00
10.2	3	6.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.971 with 1 d.f.

probability = 0.0463

Seção 2.13 - via115hx10 c1_15hxc10, bonferroni means st

1.15h x		
10.20h x	Summary of medias	
10.25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
1.15	655	17.320508
10.2	73.666667	19.629909
10.25	2576	3173.6112
-----+-----		
Total	1101.5556	1950.4758

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	10289861.6	2	5144930.78	1.53
0.2900				
Within groups	20144986.7	6	3357497.78	

Total	30434848.2	8	3804356.03	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 28.3041
 Prob>chi2 = 0.000

Comparison of medias by 1.15h x 10.20h x 10.25h

(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean		1.15	10.2
-----+-----			
10.2	-581.333		
		1.000	

10.25		1921	2502.33
		0.739	0.436

```
. kwallis via115hx10, by ( c1_15hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

c1_15h~10	_Obs	_RankSum
1.15	3	15.00
10.2	3	6.00
10.25	3	24.00

chi-squared = 7.200 with 2 d.f.

probability = 0.0273

chi-squared with ties = 7.322 with 2 d.f.

probability = 0.0257

```
var2, by ( var1)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

var1	_Obs	_RankSum
1.15	3	15.00
10.2	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**

wo-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

var1	obs	rank sum	expected
-----+-----			
1.1499999761	3	15	10.5
10.199999809	3	6	10.5
-----+-----			
combined	6	21	21

unadjusted variance 5.25

adjustment for ties -0.30

adjusted variance 4.95

Ho: var2(var1==1.149999976158142) =
var2(var1==10.19999980926514)

z = 2.023

Prob > |z| = **0.0431**

var4, by (var3)

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

var3	_Obs	_RankSum
10.2	3	6.00
10.25	3	15.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.971 with 1 d.f.

probability = 0.0463


```
var5, by ( var7)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

var7	_Obs	_RankSum
1.15	3	6.00
10.25	3	15.00

chi-squared = 3.857 with 1 d.f.

probability = 0.0495

chi-squared with ties = 3.971 with 1 d.f.

probability = **0.0463**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

var3	obs	rank sum	expected
-----+-----			
10.199999809	3	6	10.5
10.25	3	15	10.5
-----+-----			
combined	6	21	21

unadjusted variance 5.25

adjustment for ties -0.15

adjusted variance 5.10

Ho: var4(var3==10.19999980926514) = var4(var3==10.25)

z = -1.993

Prob > |z| = **0.0463**

Seção 2.14 - via120hx10 c1_20hxc10, bonferroni means st

10.15h x |

1.20h x	Summary of medias	
10.25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
1.2	606.33333	96.666092
10.15	16405.333	594.66069
10.25	2576	3173.6112
-----+-----		
Total	6529.2222	7628.958

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	444738448	2	222369224	63.93
0.0001				
Within groups	20869547.3	6	3478257.89	

Total	465607996	8	58200999.4	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 11.6875$
 Prob> $\chi^2 = 0.003$

Comparison of medias by 10.15h x 1.20h x 10.25h
 (Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	1.2	10.15
-----+-----		
10.15	15799	
	0.000	
10.25	1969.67	-13829.3
	0.730	0.000

```
vial20hx10, by ( c1_20hxc10)
```

```
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
```

c1_20h~10	_Obs	_RankSum
1.2	3	7.00
10.15	3	24.00
10.25	3	14.00

```
chi-squared =      6.489 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0390
```

```
chi-squared with ties =      6.489 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0390
```

```
.
```

Seção 2.15 - via125hx10 c1_25hxc10, bonferroni means st

10.15h x		
10.20h x	Summary of medias	
1.25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
1.25	164.33333	54.647354
10.15	16405.333	594.66069
10.2	73.666667	19.629909
-----+-----		
Total	5547.7778	8148.7393

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	530501638	2	265250819	2229.04
0.0000				
Within groups	713986.00	6	118997.667	

Total	531215624	8	66401952.9	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 13.6288$
 Prob> $\chi^2 = 0.001$

Comparison of medias by 10.15h x 10.20h x 1.25h

(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean		1.25	10.15
-----+-----			
10.15		16241	
		0.000	

```

10.2 |    -90.6667    -16331.7
      |         1.000         0.000

```

```
via125hx10, by ( c1_25hxc10)
```

```
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
```

c1_25h~10	_Obs	_RankSum
1.25	3	15.00
10.15	3	24.00
10.2	3	6.00

```
chi-squared =      7.200 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0273
```

```
chi-squared with ties =      7.261 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0265
```

Capítulo 3 – MDA

Seção 3.1 - mda15h c15_hor, bonferroni means st

Summary of medias		
concxhor	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.15	.04266333	.02013289
1.15	.03900333	.00986577
10.15	.04377667	.00531211
-----+-----		
Total	.04181444	.01172172

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.00003742	2	.00001871	0.11
0.9013				
Within groups	.00106177	6	.000176962	

Total	.00109919	8	.000137399	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 2.6263$
 Prob> $\chi^2 = 0.269$

Comparison of medias by concxhor (Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	
-----+-----	
1.15	-.00366
	1.000

10.15		.001113	.004773
		1.000	1.000

Seção 3.2 - . oneway mda20h c20_hor, bonferroni means st

Summary of medias		
concxhor	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.2	.02444333	.0032678
1.2	.02889	.00837056
10.2	.01533667	.00208167
-----+-----		
Total	.02289	.00755441

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.000286397	2	.000143199	5.05
0.0518				
Within groups	.000170156	6	.000028359	

Total	.000456553	8	.000057069	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 3.1923
 Prob>chi2 = 0.203

Comparison of medias by concxhor
 (Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean		.2	1.2

```

-----+-----
      1.2 |      .004447
          |      1.000
          |
      10.2 |     -.009107     -.013553
          |      0.243      0.062

```

est: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

c20_hor	_Obs	_RankSum
.2	3	17.00
1.2	3	22.00
10.2	3	6.00

chi-squared = 5.956 with 2 d.f.
probability = 0.0509

chi-squared with ties = 6.006 with 2 d.f.
probability = 0.0496

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

var2	_Obs	_RankSum
1.2	3	15.00
10.2	3	6.00

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

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

Seção 3.3 - mda25h c25_hor, bonferroni means st

Summary of medias		
concxhor	Mean	Std. Dev.
.25	.04333333	.01068561
1.25	.04366667	.03236143
10.25	.01989	.00583578
Total	.03563	.02093452

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				
Between groups	.001115031	2	.000557515	1.40
Within groups	.002391001	6	.0003985	
Total	.003506032	8	.000438254	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 4.4892$
 Prob> $\chi^2 = 0.106$

Comparison of medias by concxhor
 (Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	.25 1.25
1.25	.000333
	1.000

```

10.25 |    -.023443    -.023777
      |         0.601      0.585

```

Seção 3.4 - mda_0 conc_0, bonferroni means st

```

      |      Summary of medias
conc_0xhor |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
      .15 |    .04266333   .02013289
      .2  |    .02444333   .0032678
      .25 |    .04333333   .01068561
-----+-----
      Total |    .03681333   .01478867

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups        .000689249      2    .000344625    1.95
0.2226
Within groups         .001060388      6    .000176731
-----
Total                 .001749638      8    .000218705
-----

```

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 3.9488
 Prob>chi2 = 0.139

Comparison of medias by conc_0xhor
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      .15      .2
-----+-----

```

```

.2 |      -.01822
   |      0.433
   |
.25 |      .00067      .01889
    |      1.000      0.397

```

Seção 3.5 - mda_1 conc_1, bonferroni means st

```

          |      Summary of medias
conc_1xhor |      Mean      Std. Dev.
-----+-----
    1.15 |      .03900333   .00986577
    1.2  |      .02889     .00837056
    1.25 |      .04366667   .03236143
-----+-----
    Total |      .03718667   .0186135

```

```

          Analysis of Variance
Source          SS          df          MS          F
Prob > F
-----
Between groups   .000342376      2   .000171188      0.42
0.6733
Within groups    .002429323      6   .000404887
-----
Total            .002771699      8   .000346462
-----

```

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 3.6480
 Prob>chi2 = 0.161

Comparison of medias by conc_1xhor
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      1.15      1.2
-----+-----
      1.2 |   -.010113
          |      1.000
          |
      1.25 |   .004663   .014777
          |      1.000   1.000

```

Seção 3.6 - mda_10 conc_10, bonferroni means st

```

          | Summary of medias
conc_10xhor |      Mean  Std. Dev.
-----+-----
      10.15 |   .04377667   .00531211
      10.2  |   .01533667   .00208167
      10.25 |    .01989   .00583578
-----+-----
      Total |   .02633444   .01384447

```

```

                          Analysis of Variance
Source                   SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups          .001400139      2    .00070007    31.53
0.0007
Within groups          .000133216      6    .000022203
-----
Total                   .001533356      8    .000191669
-----

```

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 1.5812$
 Prob> $\chi^2 = 0.454$

Comparison of medias by conc_10xhor

(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	10.15	10.2
-----+-----		
10.2	-.02844	
	0.001	
10.25	-.023887	.004553
	0.002	0.844

Seção 3.7 - mda15hx1 ct_15hxc1, bonferroni means st

contr15h x		
concl_20h x	Summary of medias	
concl_25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.15	.04266333	.02013289
1.2	.02889	.00837056
1.25	.04366667	.03236143
-----+-----		
Total	.03840667	.02077975

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.000409061	2	.000204531	0.40
0.6852				
Within groups	.003045324	6	.000507554	

Total .003454385 8 .000431798

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 2.4230$
 Prob> $\chi^2 = 0.298$

Comparison of medias by contr15h x concl_20h x
 concl_25h

(Bonferroni)

Row Mean-|

Col Mean | .15 1.2

-----+-----

1.2 | -.013773

| 1.000

|

1.25 | .001003 .014777

| 1.000 1.000

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

ct_15hxc1	_Obs	_RankSum
.15	3	18.00
1.2	3	12.00
1.25	3	15.00

chi-squared = 0.800 with 2 d.f.

probability = 0.6703

chi-squared with ties = 0.800 with 2 d.f.

probability = 0.6703

.

Seção 3.8 - mda20hx1 ct_20hx1, bonferroni means st

Summary of medias		
concxhor	Mean	Std. Dev.
.2	.02444333	.0032678
1.15	.03900333	.00986577
1.25	.04366667	.03236143
Total	.03570444	.01908476

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				
Between groups	.000603277	2	.000301638	0.78
Within groups	.002310548	6	.000385091	
Total	.002913825	8	.000364228	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 6.4802$
 Prob> $\chi^2 = 0.039$

Comparison of medias by concxhor (Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	
.2	1.15
1.15	.01456
	1.000

1.25		.019223	.004663
		0.826	1.000

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

ct_20hx1	_Obs	_RankSum
.2	3	9.00
1.15	3	20.00
1.25	3	16.00

chi-squared = 2.756 with 2 d.f.

probability = 0.2521

chi-squared with ties = 2.779 with 2 d.f.

probability = 0.2492

Seção 3.9 - mda25hx1 ct_25hx1, bonferroni means st

Summary of mda		
concxhor	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.25	.04333333	.01068561
1.15	.03900333	.00986577
1.2	.02889	.00837056
-----+-----		
Total	.03707556	.0105641

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.000329638	2	.000164819	1.76
0.2510				
Within groups	.000563164	6	.000093861	

Total	.000892802	8	.0001116	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 0.0983$
 Prob> $\chi^2 = 0.952$

Comparison of mda by concxhor
 (Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	.25	1.15
-----+-----		
1.15	-.00433	
	1.000	

1.2		-.014443	-.010113
		0.353	0.745

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

ct_25hx1	_Obs	_RankSum
.25	3	20.00
1.15	3	16.00
1.2	3	9.00

chi-squared = 2.756 with 2 d.f.

probability = 0.2521

chi-squared with ties = 2.756 with 2 d.f.

probability = 0.2521

Seção 3.10 - mda15hx10 ct_15hx10, bonferroni means st

Summary of medias		
concxhor	Mean	Std. Dev.
.15	.04266333	.02013289
10.2	.01533667	.00208167
10.25	.01989	.00583578
Total	.02596333	.01648314

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				
Between groups	.001286104	2	.000643052	4.35
Within groups	.000887446	6	.000147908	
Total	.00217355	8	.000271694	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 6.5302$
 Prob> $\chi^2 = 0.038$

Comparison of medias by concxhor (Bonferroni)

Row Mean-	
Col Mean	.15 10.2
10.2	-.027327
	0.100

```

10.25 |    -.022773    .004553
      |         0.185     1.000

```

```
. kwallis mda15hx10, by ( ct_15hx10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

ct_15hx10	_Obs	_RankSum
.15	3	23.00
10.2	3	8.00
10.25	3	14.00

```
chi-squared =      5.067 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0794
```

```
chi-squared with ties =      5.067 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0794
```

```
.
```

Seção 3.11 - mda20hx10 ct_20hx10, bonferroni means st

Summary of medias		
concxhor	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.2	.02444333	.0032678
10.15	.04377667	.00531211
10.25	.01989	.00583578
-----+-----		
Total	.02937	.01178447

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.000965084	2	.000482542	19.84
0.0023				
Within groups	.000145907	6	.000024318	

Total	.00111099	8	.000138874	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 0.5521$
 Prob> $\chi^2 = 0.759$

Comparison of medias by concxhor (Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	.2	10.15
-----+-----		
10.15	.019333	
	0.009	

10.25		-.004553	-.023887
		0.904	0.003

Seção 3.12 - mda25hx10 ct_25hx10, bonferroni means st

Summary of medias		
concxhor	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
.25	.04333333	.01068561
10.15	.04377667	.00531211
10.2	.01533667	.00208167
-----+-----		
Total	.03414889	.01535542

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.001592843	2	.000796422	16.28
0.0038				
Within groups	.000293468	6	.000048911	

Total	.001886312	8	.000235789	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 3.4788
 Prob>chi2 = 0.176

Comparison of medias by concxhor
 (Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean		.25	10.15
-----+-----			

```

10.15 |      .000443
      |      1.000
      |
10.2  |     -.027997     -.02844
      |      0.008      0.008

```

Seção 3.13 - mda115hx10 ct1_15hx10, bonferroni means st

```

      |      Summary of medias
ct_15hx10 |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
      1.15 |     .03900333   .00986577
      10.2 |     .01533667   .00208167
      10.25 |      .01989    .00583578
-----+-----
      Total |     .02474333   .01233698

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups        .000946163      2     .000473082    10.46
0.0111
Within groups         .000271446      6     .000045241
-----
Total                 .001217609      8     .000152201
-----

```

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 3.0494$
 Prob> $\chi^2 = 0.218$

Comparison of medias by ct_15hx10
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      1.15      10.2
-----+-----
    10.2 |    -.023667
          |      0.015
          |
    10.25 |    -.019113    .004553
          |      0.039      1.000

```

Seção 3.14 - mda120hx10 ct1_20hx10, bonferroni means st

```

          |    Summary of medias
ct1_20hx10 |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
    1.2 |      .02889   .00837056
    10.15 |     .04377667   .00531211
    10.25 |      .01989   .00583578
-----+-----
    Total |     .03085222   .01192617

```

```

                          Analysis of Variance
Source                   SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups          .000873186      2    .000436593    9.90
0.0126
Within groups          .000264682      6    .000044114
-----
Total                  .001137868      8    .000142234
-----

```

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 0.3974$
 Prob> $\chi^2 = 0.820$

Comparison of medias by ct1_20hx10

(Bonferroni)

Row Mean-

Col Mean | 1.2 10.15

-----+-----

10.15 | .014887

| 0.101

|

10.25 | -.009 -.023887

| 0.444 0.014

Seção 3.15 - mda125hx10 ct1_25hx10, bonferroni means st

| Summary of medias

concxhor | Mean Std. Dev.

-----+-----

1.25 | .04366667 .03236143

10.15 | .04377667 .00531211

10.2 | .01533667 .00208167

-----+-----

Total | .03426 .02171135

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.001611435	2	.000805717	2.24
0.1878				

Within groups	.002159628	6	.000359938	
---------------	------------	---	------------	--

Total	.003771063	8	.000471383	
-------	------------	---	------------	--

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 9.6505$
 Prob> $\chi^2 = 0.008$

Comparison of medias by concxhor
 (Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean		1.25	10.15
-----+-----			
10.15		.00011	
		1.000	
10.2		-.02833	-.02844
		0.352	0.348

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

ctl_25~10	_Obs	_RankSum
1.25	3	17.00
10.15	3	21.00
10.2	3	7.00

chi-squared = 4.622 with 2 d.f.
 probability = 0.0992

chi-squared with ties = 4.622 with 2 d.f.
 probability = 0.0992

.

Capítulo 4 – Peróxido de Hidrogênio

Seção 4.1 - per15h conc, bonferroni means st

```

0=contr x 1 |      Summary of medias
          x 10 |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
          0 |    58.237553   .01678555
          1 |    58.22878   .01098688
          10 |    58.218444   .00394912
-----+-----
        Total |    58.228259   .01315809

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups      .000548959         2   .00027448    1.97
0.2200
Within groups      .000836123         6   .000139354
-----
Total              .001385082         8   .000173135
-----

```

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 2.6667
 Prob>chi2 = 0.264

Comparison of medias by 0=contr x 1 x 10
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |          0          1
-----+-----
          1 |   -.008773
          |    1.000

```

10		-.019109	-.010337
		0.284	0.974

Seção 4.2 - per20h conc, bonferroni means st

0=contr x 1		Summary of medias	
x 10		Mean	Std. Dev.
-----+-----			
0		58.216333	.00057703
1		58.315109	.07021077
10		58.287668	.0589975
-----+-----			
Total		58.273037	.06365894

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.015598501	2	.00779925	2.78
0.1397				
Within groups	.01682118	6	.00280353	

Total	.032419681	8	.00405246	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 13.5125
Prob>chi2 = 0.001

Comparison of medias by 0=contr x 1 x 10
 (Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean		0	1
-----+-----			

```

1 |      .098776
  |      0.187
  |
10 |     .071335    -.027442
   |      0.450      1.000

```

```
per20h, by ( conc)
```

```
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
```

conc	_Obs	_RankSum
0	3	6.00
1	3	20.00
10	3	19.00

```
chi-squared =      5.422 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0665
```

```
chi-squared with ties =      5.468 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0650
```

```
.
```

Seção 4.3 - per25h conc, bonferroni means st

```

0=contr x 1 |      Summary of medias
          x 10 |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
          0 |      58.29333   .06954155
          1 |      58.331999   .03897949
          10 |      58.388442   .07488327
-----+-----
        Total |      58.337924   .06860502

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups      .013727329        2   .006863665    1.72
0.2566
Within groups      .023925866        6   .003987644
-----
Total              .037653195        8   .004706649
-----

```

```

Bartlett's test for equal variances:  chi2(2) =  0.7054
Prob>chi2 = 0.703

```

Comparison of medias by 0=contr x 1 x 10
(Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      0      1
-----+-----
          1 |      .03867
          |      1.000
          |

```

10	.095112	.056442
	0.344	0.947

Seção 4.4 - per0 horas, bonferroni means st

15 h x 20h	Summary of medias	
x 25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
15	58.237553	.01678555
20	58.216333	.00057703
25	58.29333	.06954155
-----+-----		
Total	58.249072	.04965653

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.00948994	2	.00474497	2.78
0.1397				
Within groups	.01023623	6	.001706038	

Total	.01972617	8	.002465771	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 15.2192
 Prob>chi2 = **0.000**

Comparison of medias by 15 h x 20h x 25h
 (Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	15	20
-----+-----		
20	-.02122	

```

      |      1.000
      |
25 |      .055777      .076997
      |      0.448      0.188
per0, by ( horas)

```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

horas	_Obs	_RankSum
15	3	18.00
20	3	6.00
25	3	21.00

```

chi-squared =      5.600 with 2 d.f.
probability =      0.0608

```

```

chi-squared with ties =      5.647 with 2 d.f.
probability =      0.0594

```


Seção 4.5 - perl horas, bonferroni means st

Summary of medias		
15 h x 20h	Mean	Std. Dev.
x 25h		
-----+-----		
15	58.22878	.01098688
20	58.315109	.07021077
25	58.331999	.03897949
-----+-----		
Total	58.291963	.06278093

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.018392234	2	.009196117	4.20
0.0724				
Within groups	.013139328	6	.002189888	

Total	.031531562	8	.003941445	

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 4.0129$
 Prob> $\chi^2 = 0.134$

Comparison of medias by 15 h x 20h x 25h
 (Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	15	20
-----+-----		
20	.086329	
	0.194	

25	.103219	.01689
	0.107	1.000

Seção 4.6 - per10 horas, bonferroni means st

15 h x 20h	Summary of medias	
x 25h	Mean	Std. Dev.
-----+-----		
15	58.218444	.00394912
20	58.287668	.0589975
25	58.388442	.07488327
-----+-----		
Total	58.298184	.08807268

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.04384677	2	.021923385	7.22
0.0253				
Within groups	.018207611	6	.003034602	

Total	.062054381	8	.007756798	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 7.3958
 Prob>chi2 = **0.025**

Comparison of medias by 15 h x 20h x 25h
 (Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	15	20
-----+-----		
20	.069224	

```

      |      0.524
      |
25 |      .169998      .100774
      |      0.028      0.199

```

```
per10, by ( horas)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

horas	_Obs	_RankSum
15	3	7.00
20	3	15.00
25	3	23.00

```
chi-squared =      5.689 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0582
```

```
chi-squared with ties =      5.689 with 2 d.f.
```

```
probability =      0.0582
```

Seção 4.7 - per0_15hx1 ct_15hxc1, bonferroni means st

```

contr15h x |
concl_20h x |      Summary of medias
  concl_25h |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
      .15 |   58.237553   .01678555
      1.2 |   58.315109   .07021077
      1.25 |   58.331999   .03897949
-----+-----
      Total |   58.294887   .05987688

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups      .015220508        2   .007610254    3.39
0.1034
Within groups      .013461414        6   .002243569
-----
Total              .028681922        8   .00358524
-----

```

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 2.7448$
 Prob> $\chi^2 = 0.254$

Comparison of medias by contr15h x concl_20h x
 concl_25h

(Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      .15      1.2
-----+-----
      1.2 |   .077557
          |   0.275
          |

```

```

1.25 |      .094447      .01689
      |      0.151      1.000

```

Seção 4.8 - per0_20hx1 ct_20hx1, bonferroni means st

```

1.15 x 0.20 |      Summary of medias
      x 1.25 |      Mean      Std. Dev.
-----+-----
      .2 |      58.216333      .00057703
      1.15 |      58.22878      .01098688
      1.25 |      58.331999      .03897949
-----+-----
      Total |      58.259037      .05859698

```

```

                        Analysis of Variance
Source                  SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups          .024187958        2      .012093979      22.12
0.0017
Within groups           .00328089         6      .000546815
-----
Total                   .027468848        8      .003433606
-----

```

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 12.9151
Prob>chi2 = 0.002

Comparison of medias by 1.15 x 0.20 x 1.25
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      .2      1.15
-----+-----
      1.15 |      .012447

```

		1.000	
1.25		.115667	.103219
		0.003	0.005

```
per0_20hx1, by ( ct_20hx1)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

ct_20hx1	_Obs	_RankSum
.2	3	6.00
1.15	3	15.00
1.25	3	24.00

chi-squared = 7.200 with 2 d.f.

probability = 0.0273

chi-squared with ties = 7.261 with 2 d.f.

probability = 0.0265

Seção 4.9 - per0_25hx1 ct_25hx1, bonferroni means st

```

1.15 x 1.20 |      Summary of medias
      x 0.25 |      Mean   Std. Dev.
-----+-----
      .25 |      58.29333   .06954155
      1.15 |      58.22878   .01098688
      1.2 |      58.315109   .07021077
-----+-----
      Total |      58.279073   .06311331

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups      .012093734        2   .006046867    1.83
0.2389
Within groups      .019772582        6   .00329543
-----
Total              .031866316        8   .003983289
-----

```

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 4.1247$
 Prob> $\chi^2 = 0.127$

Comparison of medias by 1.15 x 1.20 x 0.25
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      .25      1.15
-----+-----
      1.15 |      -.06455
          |      0.653
          |

```

```

1.2 |      .021779      .086329
    |      1.000      0.345

```

Seção 4.10 - per0_15hx10 ct_15hxc10, bonferroni means st

```

0.15 x |

```

```

10.20 x |      Summary of medias

```

```

10.25 |      Mean      Std. Dev.

```

```

-----+-----
      .15 |      58.237553      .01678555
      10.2 |      58.287668      .0589975
      10.25 |      58.388442      .07488327
-----+-----
      Total |      58.304554      .08229093

```

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F
Between groups	.035434447	2	.017717224	5.67
Within groups	.018739929	6	.003123322	
Total	.054174377	8	.006771797	

Prob > F

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 2.8016
 Prob>chi2 = 0.246

Comparison of medias by 0.15 x 10.20 x 10.25

(Bonferroni)

```

Row Mean-|

```

```

Col Mean |      .15      10.2

```

```

-----+-----
      10.2 |      .050115

```



```

          |          0.943
          |
10.25h   |          .150889      .100774
          |          0.049      0.208

```

Seção 4.11 - per0_20hx10 ct_20hxc10, bonferroni means st

```

10.15h x |
0.20h x |      Summary of medias
10.25h |      Mean      Std. Dev.
-----+-----
      .2 |      58.216333      .00057703
10.15h |      58.218444      .00394912
10.25h |      58.388442      .07488327
-----+-----
Total   |      58.274406      .0933891

```

```

                                Analysis of Variance
Source                          SS          df      MS          F
Prob > F
-----
Between groups      .05852533          2      .029262665      15.61
0.0042
Within groups      .011246867          6      .001874478
-----
Total              .069772196          8      .008721525
-----

```

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 20.1749
Prob>chi2 = 0.000

Comparison of medias by 10.15h x 0.20h x 10.25h
 (Bonferroni)

Row Mean-|

Col Mean		.2	10.15
-----+-----			
10.15		.002111	
		1.000	
10.25		.172109	.169998
		0.008	0.009

```
per0_20hx10, by ( ct_20hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

ct_20h~10	_Obs	_RankSum
.2	3	9.00
10.15	3	12.00
10.25	3	24.00

```
chi-squared =      5.600 with 2 d.f.
probability =      0.0608
```

```
chi-squared with ties =      5.793 with 2 d.f.
probability =      0.0552
```

Seção 4.12 - per0_25hx10 ct_25hxc10, bonferroni means st

```

10.15h x |
10.20h x |      Summary of medias
      0.25h |      Mean      Std. Dev.
-----+-----
      .25 |      58.29333      .06954155
    10.15 |      58.218444      .00394912
    10.2 |      58.287668      .0589975
-----+-----
      Total |      58.26648      .05819863

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS                df                MS                F
Prob > F
-----
Between groups        .01043199                2      .005215995      1.88
0.2326
Within groups         .016664657                6      .002777443
-----
Total                 .027096647                8      .003387081
-----

```

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 7.2033
Prob>chi2 = 0.027

Comparison of medias by 10.15h x 10.20h x 0.25h
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      .25      10.15
-----+-----
    10.15 |      -.074886
          |      0.397

```

10.2		-.005662	.069224
		1.000	0.476

```
per0_25hx10, by ( ct_25hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

ct_25h~10	_Obs	_RankSum
.25	3	18.00
10.15	3	8.00
10.2	3	19.00

```
chi-squared =      3.289 with 2 d.f.
probability =      0.1931
```

```
chi-squared with ties =      3.289 with 2 d.f.
probability =      0.1931
```

Seção 4.13 - per1_15hx10 c1_15hxc10, bonferroni means st

1.15h x 10. |

Summary of medias		
20h x	Mean	Std. Dev.
10.25h		
-----+-----		
1.15	58.22878	.01098688
10.2	58.287668	.0589975
10.25	58.388442	.07488327
-----+-----		
Total	58.30163	.08480333

Analysis of Variance				
Source	SS	df	MS	F
Prob > F				

Between groups	.039114991	2	.019557495	6.37
0.0328				
Within groups	.018417843	6	.003069641	

Total	.057532834	8	.007191604	

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 4.1035
 Prob>chi2 = 0.129

Comparison of medias by 1.15h x 10. 20h x 10.25h
 (Bonferroni)

Row Mean-|

Col Mean	1.15	10.2
-----+-----		
10.2	.058887	
	0.722	

```

10.25 |      .159662      .100774
      |      0.037      0.202

```

Seção 4.14 - per1_20hx10 c1_20hxc10, bonferroni means st

```

10.15h x |
1.20h x |      Summary of medias
10.25h |      Mean      Std. Dev.
-----+-----
      1.2 |      58.315109      .07021077
      10.15 |      58.218444      .00394912
      10.25 |      58.388442      .07488327
-----+-----
      Total |      58.307332      .08994901

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS          df          MS          F
Prob > F
-----
Between groups      .043621286          2      .021810643      6.20
0.0347
Within groups      .021105304          6      .003517551
-----
Total              .06472659          8      .008090824
-----

```

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 7.5513
 Prob>chi2 = **0.023**

Comparison of medias by 10.15h x 1.20h x 10.25h
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      1.2      10.15
-----+-----

```

```

10.15 |    -.096666
      |      0.279
      |
10.25 |    .073332    .169998
      |      0.542      0.038

```

```
perl_20hx10, by ( c1_20hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

c1_20h~10	_Obs	_RankSum
1.2	3	17.00
10.15	3	6.00
10.25	3	22.00

chi-squared = 5.956 with 2 d.f.

probability = 0.0509

chi-squared with ties = 5.956 with 2 d.f.

probability = 0.0509

.

Seção 4.15 - per1_25hx10 c1_25hxc10, bonferroni means st

```

10.15h x |
10.20h x |      Summary of medias
      1.25h |      Mean      Std. Dev.
-----+-----
      1.25 |      58.331999      .03897949
      10.15 |      58.218444      .00394912
      10.2  |      58.287668      .0589975
-----+-----
      Total |      58.27937      .06091349

```

```

                        Analysis of Variance
Source                SS                df                MS                F
Prob > F
-----
Between groups        .019652227            2        .009826113            5.88
0.0386
Within groups         .010031403            6        .0016719
-----
Total                 .029683629            8        .003710454
-----

```

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 6.6062$
Prob>chi2 = 0.037

Comparison of medias by 10.15h x 10.20h x 1.25h
 (Bonferroni)

```

Row Mean-|
Col Mean |      1.25      10.15
-----+-----
      10.15 |      -.113556
            |      0.043

```


10.2		-.044332	.069224
		0.698	0.250

```
perl_25hx10, by ( c1_25hxc10)
```

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

c1_25h~10	_Obs	_RankSum
1.25	3	20.00
10.15	3	7.00
10.2	3	18.00

chi-squared = 4.356 with 2 d.f.

probability = 0.1133

chi-squared with ties = 4.356 with 2 d.f.

probability = 0.1133