



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

PEDRO LUCAS BUENO DA SILVA

**DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DE SOLOS DE CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR E
AVALIAÇÃO DA TOXIDADE DOS METABOLITOS GERADOS
SOBRE PEIXES**

São José do Rio Preto

2015

PEDRO LUCAS BUENO DA SILVA

**DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DE SOLOS DE CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR E
AVALIAÇÃO DA TOXIDADE DOS METABOLITOS GERADOS
SOBRE PEIXES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2015

Silva, Pedro Lucas Bueno da.

Degradação do herbicida diuron por bactérias isoladas de solos de cultura de cana-de-açúcar e avaliação da toxicidade dos metabolitos gerados sobre peixes / Pedro Lucas Bueno da Silva. – São José do Rio Preto, 2015

73 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Toxicologia ambiental. 3. Herbicidas - Biodegradação. 4. Diuron. 5. Bactérias. 6. Peixe - Efeito da poluição da água. I. Gomes, Eleni. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

PEDRO LUCAS BUENO DA SILVA

**DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DE SOLOS DE CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR E
AVALIAÇÃO DA TOXIDADE DOS METABOLITOS GERADOS
SOBRE PEIXES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Dr. Thiago Scremin Pereira
UNESP – São José do Rio Preto

Co-Orientador

Dr. Marcio Luis Busi da Silva
EMBRAPA – Concórdia/SC

Prof^o Dr. Marcelo de Freitas Lima
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

2015

Dedico este trabalho a minha família, principalmente meus pais, Amarildo e Tânia, que sempre me apoiaram em todos os momentos e é um dos principais motivos para eu seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado, me guiando e auxiliando nos momentos de dificuldade, me mostrando os melhores caminhos, dando força, sabedoria, coragem e muita fé, para que eu possa seguir meus sonhos e atingir meu objetivo. Pela oportunidade de mostrar as pessoas que sempre torceram, rezaram e auxiliaram até essa conquista.

Aos meus pais, Amarildo e Tânia, pelo amor e carinho incondicional, por todo apoio, por sempre estarem ao meu lado, nunca ter abaixado a cabeça para que eu possa seguir meus sonhos.

Agradeço também a minha irmã, Aline, que sempre esteve junto me dando muita força, conselhos, por todo esse tempo. Ao meu cunhado, Ivan por sempre me apoiar.

A meus avós maternos, Elza, Onofre, e paternos, Geralda e Flausino (in memorian), pelas orações e palavras de conforto nos momentos de desafios.

Meus tios, Carlos Henrique, Creuza, Gisele e Helio, por sempre acreditar em meu potencial e dar toda força.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Eleni Gomes, pela confiança em meu trabalho abrindo as portas de seu laboratório, sou muitíssimo grato pela oportunidade, pela amizade, pela orientação, compartilhando seus conhecimentos para meu crescimento profissional e pessoal, agradeço também pelos seus bolos de castanha com chocolate.

Ao meu co-orientador, Thiago Scremin, pelo auxílio nos momentos de maiores dificuldades, compartilhando suas experiências e auxiliando nos experimentos.

Ao Prof^o Dr. Roberto da Silva, que confiou em meu trabalho, me auxiliando nos momentos de dificuldades para meu crescimento.

Ao pessoal do Laboratório LBMA, Angélica Rodrigues, Ariane Zanchetta, Bruna L., Bruna P., Carolina Bussoli, Christiane Nunes, Corina, Daniela, Débora Cupertino, Emily Bonfá, Erick Moraes, Gisele Martins, Fernanda Martucci, Fernando Barbosa, George Fetti, Guillermo Ladino, Isabel Zaparoli, Isabela Belei, Janaina Pires, Josiane Pereira, Márcia Moretti, Maria Cecília, Olavo Perrone, Priscila Atique, Rafaela Rodrigues, Raísa Déli, Rosimeire Onning, Sidnei Bordignon, Tássia Egea, pela amizade, por me acolher da melhor maneira possível, me apoiando e auxiliando em todos os momentos, se tornando uma família.

Especialmente o Diego, um grande amigo que não mediu esforços durante esse tempo, pela paciência e uma grande contribuição para meu trabalho e crescimento profissional.

Ao Laboratório do Profº Dr. Eduardo de Almeida, por abrir as portas do seu laboratório para que pudesse trabalhar, aos seus alunos que me receberam, especialmente a aluna Andréia que não mediu esforços em nenhum momento para me ajudar durante os experimentos, com toda dedicação e horas dentro do laboratório até a finalização dos resultados.

A Mirelle Takaki, por todo apoio, carinho e amizade, e sempre me auxiliando em todos os momentos, e feito com que meus dias passassem mais alegres e felizes, onde as dificuldades ficassem ocultas.

A minha nova amiga, Drª Camila Nomuro, que não omitiu esforços durante os experimentos com peixes e me auxiliou nos momentos que mais necessitava, com paciência e calma.

Aos meus amigos da turma de 2008 de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Votuporanga - UNIFEV, especialmente, Carol Serantoni, Daniele Oliveira, José Ulisses, Juliana Miron e Alan Miattelo, pela amizade e pela companhia durante o curso, onde conquistei muitos irmãos que sempre estiveram ao meu lado.

Aos professores da UNIFEV, Eliani Rodrigues, Alessandra Mello, João C. Bonfanti, Encarnação Manzano, Ângelo, Fernando Dionísio, Marisa Dionísio, Valter Brighetti, Fádua Hits, Valéria Perissini.

Ao Marcio Busi, que me deu todo apoio e incentivo para meu crescimento profissional, com singelas palavras me guiaram em busca do meu sonho.

Aos meus amigos, Rodney, Lucas Magno, Fernando Cassalho, Rafael Bonner, Daniela Silva, Elcio Dorte, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e me dando mais forças para continuar.

Aos funcionários, técnicos, zeladoria do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – IBILCE, por dar o auxílio necessário para elaboração do trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisadores do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que, contribuíram de alguma forma, direta e indireta para que meus sonhos se tornassem realidade.

MUITO OBRIGADO!

“Eu agradeço a todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito” (Chico Xavier).

RESUMO

A intensificação da agricultura tem levado um aumento da utilização de pesticidas, o que pode carrear esses compostos e seus derivados do solo para ambientes aquáticos. Para minimizar a presença desses compostos xenobióticos no meio, tem se sugerido técnicas de biorremediação que utiliza a atividade de micro-organismos para eliminação ou redução desses poluentes. O ataque de compostos aromáticos e clorados por micro-organismos ou por suas enzimas livres no meio podem levar ao desejável processo de biodegradação, originando derivados quimicamente mais simples e menos tóxicos até a mineralização total do composto. O objetivo do trabalho foi estudar a degradação do diuron por cepas bacterianas previamente isoladas de solos de cultivo de cana-de-açúcar com histórico de aplicação desse herbicida, em fermentação submersa e em microcosmos e avaliar a toxicidade dos compostos derivados do diuron gerados pelo metabolismo microbiano. Todas as bactérias testadas foram capazes de crescer em presença do diuron, porém nem todas foram capazes de degradá-lo quando cultivadas em meio líquido. Quando se utilizou sistemas de cultivo em solo acrescido de diuron (microcosmos) obteve-se até 50% do composto. Nos testes de toxicidade dos metabólitos do diuron sobre peixes foi utilizada a atividade enzimática da 7-etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) e teste do cometa como referencia. Foi observada uma inibição da atividade da EROD, possivelmente relacionada a uma inibição das isoenzimas do citocromo P450. Os testes do cometa não mostraram diferenças significativas entre os organismos controle e os expostos ao diuron, tendo sido detectado o aumento em apenas um tratamento. Os testes de toxicidade mostraram que, dentro das concentrações de metabólito testadas, alterações metabólicas ocorreram, mas não se detectou danos no DNA. Dessa forma, concluímos que os metabólitos promovem alterações nos organismos expostos.

Palavras-chave: Bactéria, Diuron, Toxicidade.

ABSTRACT

The intensification of agriculture has led an increase in the use of pesticides, which may carry these compounds and their derivatives from soil to aquatic environments. To minimize the presence of xenobiotics in the environment, it has been suggested bioremediation techniques that use the activity of microorganisms to eliminate or reduce these pollutants. The attack of aromatic and chlorinated compounds by microorganisms or their enzymes free in the medium can lead to desirable biodegradation process, yielding chemically simpler and less toxic derivatives until the total mineralization of the compound. The aim of this work was to study the degradation of diuron by bacterial strains previously isolated from cane sugar cultivation of soils with application history of this herbicide in submerged fermentation and in microcosms and evaluate the toxicity of diuron derived from compounds generated by metabolism microbial. All bacteria tested were able to grow in the presence of diuron, but not all were able to degrade it when cultured in liquid medium. When used in a soil cultivation systems plus diuron (microcosms) afforded 50% compound. In the tests of toxicity of the metabolites of diuron was used Fish the enzymatic activity of 7-O-etoxiresorufina deetilase (EROD) and comet assay as a reference. Was observed inhibition of EROD activity, possibly related to an inhibition of cytochrome P450. Comet tests showed no significant differences between the control and organisms exposed to diuron, the increase being detected in one treatment. Toxicity tests have shown that within the tested concentrations metabolite, metabolic changes occur but are not detected in DNA damage. Thus, we conclude that the metabolites promote changes in exposed organisms.

Keywords: Bacteria, Diuron, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do Diuron	22
Figura 2: Mecanismo inicial de biotransformação do diuron.....	25
Figura 3: Curva sigmoide típica de relação dose-resposta em testes de toxicidade. A curva revela a concentração de uma substância capaz de matar 50% de uma população. (Adaptado de Costa <i>et al.</i> ,2008).	29
Figura 4: Ciclo catalítico do p450 para metabolizar o xenobiótico em um substrato solúvel envolvendo reações de oxirredução com a participação do NADPH como doador de elétrons e da enzima citocromo b5redutase como mediadora, formando uma molécula de água (Adaptado de NOGUEIRA, 2008).	31
Figura 5: Mecanismo de ação da EROD sobre o substrato 7-etoxirresorufina. (Adaptado de WHYTE <i>et al.</i> , 2000).....	32
Figura 6: Avaliação dos níveis de lesões por meio da eletroforese em gel de célula única (ensaio do cometa) a: célula normal b: célula com lesão média c: célula com lesão grave. (Adaptado de RIBEIRO <i>et al.</i> , 2007).	33
Figura 7: Gradiente da fase móvel: (B) Metanol sem aditivo.	40
Figura 8: Espécime de peixe <i>Astyanax altiparanae</i> , conhecido como lambari. (ALM Sanches, 2014).	41
Figura 9: Aquários experimentais.	42
Figura 10: Crescimento da população <i>Klebsiella oxytoca</i> TD1.46 (a) e degradação do diuron (b) em meio líquido (●) na ausência e presença de glicose (■).	46
Figura 11: Tempo de retenção dos padrões analíticos de Diuron, DCPMU, DCPU e DCA. .	47
Figura 12: Concentração de DCPU formada ao longo do cultivo da bactéria <i>K. oxytoca</i>	48
Figura 13: Degradação de diuron (a) e consumo de glicose (b) pelas bactérias selecionadas na presença de 0,05 e 0,5% de glicose, em 48h de cultivo.....	49
Figura 14: Degradação de diuron (a) e consumo de glicose (b) pelas bactérias selecionadas na presença de 0,05 de glicose, em 48 h e 120 h de cultivo.....	50

Figura 15: Teores de DCPMU (A), DCPU (B) e DCA (C) encontrados nos meios de cultivo das cepas bacterianas após 48 de fermentação em meios com diferentes concentrações de glicose.....	52
Figura 16: Cromatograma referente aos padrões injetados em LC/MS/MS.	53
Figura 17: Cromatograma para detecção da presença de diuron e seus metabólitos na amostra do meio de cultivo do do isolado TG2.31.....	53
Figura 18: Confirmação da presença de diuron e seus metabólitos na amostra do isolado TD1.10.....	54
Figura 19: Atividade enzimática da 7-etoxiresorufina-Odeetilase (EROD). Controle= peixes em aquários sem contaminantes; DSB=Adição de meio com diuron sem crescimento bacteriano (controle abiótico); DCB= adição de meio de cultura com diuron após crescimento bacteriano.....	63
Figura 20: Scores obtidos com o ensaio de cometa em eritrócitos de lambaris. Controle= peixes em aquários sem contaminantes; DSB=Adição de meio com diuron sem crescimento bacteriano (controle abiótico); DCB= adição de meio de cultura com diuron após crescimento bacteriano; MC= adição do meio de cultura sem diuron e sem crescimento bacteriano.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Característica físico-químicas do herbicida diuron.	23
Tabela 2: Bactérias selecionadas para desenvolvimento do projeto.....	35
Tabela 3: Planejamento Experimental: Modelo Plackett-Burman (valores em %).	37
Tabela 4: Microorganismos selecionados para desenvolvimento do consórcio.	38
Tabela 5: Síntese da degradação de diuron e produção de metabólitos pelas cepas bacterianas..	54
Tabela 6: Planejamento Experimental Modelo Plackett-Burman: Variáveis estudadas e resultadas em % de degradação de diuron.	57
Tabela 7: Concentração dos metabólitos a) DCPMU, b) DCPU e c) DCA, em mg.L ⁻¹ , originado após 120h de experimento.	58
Tabela 8: Degradação de diuron e produção de metabólitos por consórcios microbianos com bactéria e o fungo <i>Mortirella alpina</i>	60
Tabela 9: Degradação do diuron e geração de subprodutos em ensaios de microcosmos. Foram utilizadas em culturas bacterianas puras, 10 mg de diuron /g de solo com 30% de umidade e 7 dias de cultivo.	61
Tabela 10: Características do meio obtido após o cultivo <i>Leucobacter</i> sp TG3.14.	62
Tabela 11: Planejamento Plackett-Burman, analisado em programa Statistic versão 7.0, para cada bactéria.	71

LISTA DE ABREVIACÕES

POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
DCA	Dicloroanilina
DCPU	Diclorofeniluréia
DCPMU	Diclorofenilmetiluréia
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EPA	Environmental Protection Agency
CL₅₀	Concentração letal média
CE₅₀	Concentração de efeito
CENO	Concentração de Efeito não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROD	7-etoxirresorufina- <i>O</i> -deetilase
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
GST	Glutathione S-transferases
SCGE	Single Cell Gell Eletroforesis
LBMA	Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada
N,P,K	Nitrogênio, Fósforo e Cálcio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
DSB 0,15	Tratamento com meio de cultura do controle abiótico (sem inóculo da bactéria) diluído até concentração de diuron de 0,15 mg L ⁻¹
DSB 0,015	Tratamento com meio de cultura do controle abiótico (sem inóculo da bactéria) diluído até concentração de diuron de 0,015 mg L ⁻¹
DCB 0,15	Tratamento com meio de cultura fermentado pela bactéria, diluído até concentração de diuron residual de 0,15 mg L ⁻¹

DCB 0,015

Tratamento com meio de cultura fermentado pela bactéria, diluído até concentração de diuron residual de 0,015 mg L⁻¹

LC/MS

Liquid chromatography-mass spectrometry

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 HERBICIDA DIURON.....	21
2.2 VIAS DE DEGRADAÇÃO TOXICIDADE E DO HERBICIDA DIURON	24
2.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO DIURON.....	27
2.3.1 Enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante	29
2.4 MARCADORES GENOTÓXICOS	32
3 OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO GERAL.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. CEPAS BACTERIANAS.....	34
4.2 CULTIVO PARA AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO DIURON EM MEIO SÓLIDO	35
4.3 DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO DIURON EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	35
4.3.1 Crescimento da bactéria referencia em meio com diuron.....	35
4.3.2 Avaliação do efeito da glicose sobre a degradação do diuron	36
4.3.3 Planejamento experimental Plackett-Burman (PB) para avaliação do efeito da composição nutricional do meio de cultivo sobre a degradação do diuron	36
4.4 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE DIURON PELAS CEPAS EM CULTIVO SUBMERSO.....	37
4.5 CONSÓRCIO DE MICROORGANISMOS	37
4.6 ENSAIO DE MICROCOSMOS	38
4.6.1 Coleta do solo	38
4.6.2 Preparo do Pré-inóculo	39

4.6.3 Preparo do inóculo	39
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	39
4.8 TESTES DE TOXIDADE EM PEIXES	41
4.8.1 Organismo Teste.....	41
4.8.2 Exposição dos peixes ao diuron e seus metabólitos para análises de biomarcadores bioquímicos.....	42
4.8.2.1 Obtenção do extrato de cultivo da bactéria.....	42
4.8.2.2 Teste de toxicidade	42
4.8.3 Descarte de resíduos tóxicos e água contaminada	43
4.9 ENSAIO DO COMETA.....	43
4.9.1 Preparação das lâminas	43
4.9.2 Análise das lâminas	44
4.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	44
4.10.1 Preparo das amostras para as análises da enzima EROD.....	44
4.10.2 Análise da atividade da 7-etoxiresorufina-0-deetilase (EROD)	44
4.10.3 Análise de proteínas	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 ESTUDOS PRELIMINARES	45
5.1.1 Análise dos metabólitos derivados do diuron em meio de cultivo de <i>K. Oxytoca</i> TD 1.46.....	46
5.1.2 Avaliação do aumento da concentração de glicose na degradação do diuron pelas cepas bacterianas	48
5.1.3 Detecção do metabólitos liberados no meio de cultivo por degradação do diuron.....	51
5.1.4 Influência do meio e condições de cultivo sobre a eficiência de degradação do herbicida diuron pelas bactérias	55
5.1.5 Análise dos metabólitos gerados utilizando o planejamento de Plackett-Burman.....	58

5.2 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON POR CONSÓRCIO MICROBIANO	60
5.3 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON POR ENSAIOS DE MICROCOSMOS	61
5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO DIURON E SEUS METABÓLITOS EM PEIXES.....	61
5.4.1 A atividade enzimática da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD).....	62
6 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICE	71

1 INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, fenóis, organoclorados e outros poluentes orgânicos persistentes (POPs) são contaminantes ambientais amplamente distribuídos em solos e águas, resultantes de ação antropogênica. Devido a sua recalcitrância, bio-acumulação, toxicidade e ação carcinogênica, esses compostos xenobióticos tem grande importância em termos de poluição ambiental. (VECCHIATO *et al* 2015).

Embora possam sofrer ação de adsorção, volatilização, fotólise e degradação química, a biodegração microbiana é responsável em grande parte pela retirada desses compostos do ambiente. (GIANFREDA, *et al.*, 2006). Entretanto, essa degradação depende do tipo de composto (tamanho da cadeia carbônica, número de anéis aromáticos, ramificações e radicais substituintes), do grupo de microrganismos presentes e condições ambientais no sítio da contaminação. As condições do meio como pH, temperatura, presença de O₂, acessibilidade ao composto e a presença de nutrientes minerais e fatores iniciadores do crescimento microbiano são fatores ambientais importantes na definição dos níveis de degradação microbianas de um determinado composto.

As bactérias estão ativamente envolvidas na degradação de poluentes orgânicos e em solos, sedimentos e águas. Entre os gêneros mais comuns encontram-se *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* e *Shingomonas*. Os fungos, como gêneros *Phanaerochaete*, *Bjerkandera*, *Pleurotus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Achremonium* também foram descritos como responsáveis por degradação de poluentes orgânicos. Estes microrganismos podem mineralizar (a CO₂ e H₂O em aerobiose ou a CH₄ em anaerobiose) o composto ou biotransformá-lo em componentes mais ou menos tóxicos. (TONINI, *et al.* 2010).

O diuron, um herbicida derivado de uréia que age inibindo a fotossíntese em plantas é indicado para o controle de plantas daninhas em muitas culturas agrícolas como da cana-de-açúcar. (BLANCO, 2003; PLESE *et al.*, 2009). A ampliação das áreas de cultivo da cana-de-açúcar devido ao grande interesse por combustíveis renováveis requer uma grande quantidade de pesticidas o que pode representar uma ameaça para o meio ambiente e a saúde de seres humanos e animais.

O diuron apresenta elevado potencial tóxico para as espécies não alvo e pode ser degradado por microrganismos em compostos como a dicloroanilina (DCA),

diclorofeniluréia (DCPU) e diclorofenilmetiluréia (DCPMU) que podem ser mais tóxicos do que o próprio diuron. (FIELD *et al.*, 1997; MELLO *et al.*, 2009).

O diuron e seus metabólitos além de contaminar o solo, podem atingir rios e lagos através do escoamento das águas superficiais e lixiviação podendo causar diversos danos aos animais expostos. Os peixes podem metabolizar e armazenar poluentes presentes nos corpos d'água. Estudos sobre toxicidade crônica em peixes indicam que baixas concentrações de diuron, podem causar alterações morfológicas bioquímicas, fisiológicas e genéticas resultando em deficiência no crescimento, malformações, alterações comportamentais e disfunções reprodutivas.(ZHU,2013;ROCHA,2013).

Diante dos inúmeros danos reportados sobre peixes, reportados para diuron, é necessária uma melhor compreensão dos possíveis efeitos de seus metabólitos sobre esses organismos. Essas informações são de fundamental importância para se comprovar e justificar a utilização de processos de biorremediação do diuron por microrganismos. Além disso, essas informações irão orientar a seleção de microrganismos que gerem metabólitos menos tóxicos, a partir do diuron.

Em um trabalho prévio, realizado pelo grupo de pesquisa em Bioenergia e Meio Ambiente, do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Ibilce/Unesp, Microbiologia, foram isoladas 75 linhagens fúngicas e 400 bactérias de solo de plantação de cana-de-açúcar, no município de São José do Rio Preto, situado ao Noroeste do Estado de São Paulo; em diferentes fases do cultivo. Vários desses microrganismos apresentaram altas taxas de degradação do herbicida diuron gerando os três metabólitos principais deste herbicida a DCA, a DCPU e a DCPMU. Outro trabalho demonstrou que esses metabólitos em sua forma pura exerceram efeitos tóxicos e promoveram alterações genéticas em peixes. Na continuidade desse trabalho, o presente estudo visou avaliar a degradação do diuron por algumas dessas cepas em fermentação submersa e em microcosmos, assim como, avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos compostos derivados dessa degradação, presentes no meio de cultivo das bactérias, sobre peixes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas brasileiras e destinada a produção de açúcar e etanol. Na safra 2013/2014, a área cultivada com cana-de-açúcar ultrapassou oito milhões e meio de hectares, distribuídos por vários Estados, sendo São Paulo o maior produtor, com mais de quatro milhões e meio de área plantada (CONAB, 2013).

A estimativa de colheita para os anos de 2018/19 é de mais de 47 milhões de toneladas de cana e uma produção de mais de 58 bilhões de litros de etanol para consumo interno e externo, o que corresponde a um aumento de 3,2 % em relação a 2014 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013). Esse crescimento contínuo na produção exige um aumento em áreas plantadas que acaba gerando problemas ambientais decorrentes da monocultura, como o surgimento de pragas agrícolas e aumento do uso de praguicidas. Além disso, o uso de outros insumos como adubos e corretivos minerais também estão em franco crescimento (EMBRAPA, 2014).

Ao mesmo tempo em que o emprego de insumos agrícolas trouxe benefícios para a agricultura, sérios problemas para a população e o meio ambiente tem sido observados. Após a aplicação do produto, a sua dispersão pelo vento e lixiviação pela água das chuvas e de irrigação levam os contaminantes para outras áreas, além de atingir águas superficiais e subterrâneas. Alguns insumos são ambientalmente seguros, porém outros oferecem riscos a saúde humana e animal, tanto em sua forma original quanto como compostos derivados de sua degradação (LISBOA *et al.*, 2007, GOLOVLELA *et al.*, 1992; VELASCO & CAPANEMA, 2006).

Situações de contaminação de risco exigem ações reparadoras baseadas em métodos físico-químicos como aterro e isolamento, incineração, sedimentação, filtração, separação por solventes e diálise (FREIRE *et al.*, 2000). Novas abordagens têm sido desenvolvidas como a utilização de processos oxidativos avançados, ultra-som, ultra filtração e osmose reversa. Contudo, os recursos conhecidos, implantados ou ainda em avaliação, são bastante específicos quanto às condições de atuação e exibem limitada eficiência na eliminação de resíduos, gerando por vezes subprodutos com sérias propriedades toxicológicas. Além disso, os custos desses processos limitam suas aplicações (MORENO *et al.*, 2004).

O tratamento de amplas áreas com baixas concentrações dos contaminantes é, muitas vezes, inviável pelos métodos mencionados, exigindo a busca de métodos que possam

desintoxicar e remover compostos orgânicos utilizando estratégias corretivas baseadas no que o próprio local oferece. Assim, a biorremediação se tornou uma opção viável e promissora de recuperação de sítios contaminados (GIANFREDA *et al.*, 2006).

Quase todos os seres vivos são dotados de algum nível de habilidade de desintoxicação, como mineralização, transformação e / ou imobilização de poluentes. No entanto, os microrganismos, em função de sua grande capacidade de adaptação a condições diversas são muito ativos na degradação ou biotransformação de poluentes (BATISSON *et al.*, 2007). As bactérias possuem uma enorme diversidade metabólica que lhes permite utilizar produtos químicos complexos como fonte de carbono e energia seguindo variadas rotas metabólicas. Além disso, a simplicidade de seu genoma, comparado aos dos animais, permite rápida evolução genética e seleção de cepas portadoras de genes que expressem enzimas e sistemas de transporte para a degradação e assimilação do composto xenobiótico (NOJIRI & TSUDA, 2005).

Muitas espécies de bactérias possuem enzimas citocromo P450, conhecidas por sua capacidade em atuar em vias de degradação de herbicidas como o sulfenilureia, tendo sido sugerido que esta enzima está envolvida na desmetilação do diuron (GIACOMAZZI & COCHET, 2004).

2.1 HERBICIDA DIURON

O diuron, nome científico N-(3,4-diclorofenil)-N, N-dimetiluréia e fórmula $C_9H_{10}Cl_2N_2O$, (Figura X) pertence à família química das fenilamidas, subclasse das feniluréias e à classe toxicológica III (medianamente tóxico) (TOMAZ, 2003; GIACOMAZZI & COCHET, 2004; MONCADA, 2005). É um herbicida indicado para o controle de plantas daninhas, sendo intensivamente aplicado na cultura de cana-de-açúcar, mas também é utilizado em culturas de algodão, café, citros, soja, entre outros (BLANCO, 2003; PLESE *et al.*, 2009).

Figura 1: Fórmula estrutural do Diuron



A atividade inibidora de fotossíntese do diuron envolve plantas, algas e cianobactérias, inibindo o transporte de elétrons nas membranas fotossintéticas. O diuron compete com a plastoquinona (QB) pelo sítio de ligação desta à proteína D1 do fotossistema II, interrompendo o fluxo normal dos elétrons que permite a geração do potencial de membrana e síntese de ATP por fotofosforilação (BRUSSLAN & HASELKORN, 1989). A toxicidade do diuron também foi descrita em alguns organismos não-fotossintéticos, devido à semelhança estrutural entre os sítios de inibição situados na proteína D1 do fotossistema II e no complexo bc1 da cadeia respiratória dos eucariotos. Esse efeito impute ao diuron um nível alto de toxicidade (RAGO & COLSON, 1988).

Além de ser um herbicida muito utilizado no controle de plantas daninhas, o diuron é um produto anti-fotosintetizante para evitar o acúmulo de organismos marinhos nos cascos de barcos. Este herbicida é muitas vezes aplicado em combinação com outros herbicidas, como bromacil, tidiazuron, glifosato, o hexaninona, formando o herbicida comercial Velpar-K®. (MACIEL *et al.*, 2008).

O relatório da agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (US-EPA, 2003) apresenta o diuron como uma molécula estável à hidrólise e fotólise, sendo seu processo de degradação no ambiente principalmente microbiológico. Apresenta, como outras feniluréias, uma baixa solubilidade em água e moderada tendência de adsorção (Tabela 1), portanto, com maior lixiviação em solos com baixo teor de matéria orgânica (TIXIER *et al.*, 2000; GIACOMAZZI & COCHET, 2004)

Tabela 1: Característica físico-químicas do herbicida diuron.

Características	
Cor	Branca
Estado Físico	Sólido
Odor	Nenhum
Ponto de Fusão	158 °C
Solubilidade em água	42 mg/L a 25 °C
Característica de Corrosão	Não corrosivo
Coefficiente de partição (log K _{ow})	2.68
Pressão de vapor	2×10^{-7} mmHg a 30 °C

Modificado de Reregistration Eligibility Decision (RED) for Diuron, September, 2003.

Devido a sua moderada lixiviação e alta persistência nos solos, o diuron residual tem sido detectado em várias regiões do mundo em águas superficiais e subterrâneas (LENNARTZ *et al.*, 1997). Pesquisa desenvolvida na França em uma região produtora de vinho detectou a concentração de diuron de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ na água de escoamento superficial, apesar do intervalo de 140 dias entre a aplicação e a ocorrência das chuvas na região.

No Reino Unido, as concentrações atingiram cerca de $6,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ (THOMAS *et al.*, 2001), e em ambientes aquáticos japoneses, incluindo lagos, 86% dos analisados apresentaram a concentração de diuron por volta de $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ (OKAMURA *et al.*, 2003).

Além das áreas agrícolas, o diuron tem sido utilizado como controle de plantas daninhas em espaços urbanos em jardins, ao longo ferrovias e rodovias.

Na França, onde cerca de 133 toneladas de diuron foram fabricados até 1997, o seu uso do tem sido limitado desde 1999. (GIACOMAZZI & COCHET, 2004). Outros países da Comunidade Europeia também tem seguido nessa linha, considerando a Concentração Máxima Admissível (CMA) de qualquer pesticida individualmente na água potável de $0,1 \mu\text{g dm}^{-3}$ e a soma de todos os resíduos não pode ultrapassar $0,5 \mu\text{g dm}^{-3}$. Limites semelhantes são adotados por outros países, como Canadá e Estados Unidos (FILIZOLA *et al.*, 2002).

No Brasil, a resolução do CONAMA nº 357, de 17.03.2005, estabelece que os limites máximos de contaminantes, incluindo pesticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos, em águas depende da sua destinação. A portaria 518 de 25.03.2004 do Ministério da Saúde estabelece limites permissíveis em água destinadas ao consumo humano. Porém,

estas legislações não incluem a maioria dos herbicidas em uso atualmente e inseticidas piretróides (DORES e DE-LAONICA-FREIRE, 2001).

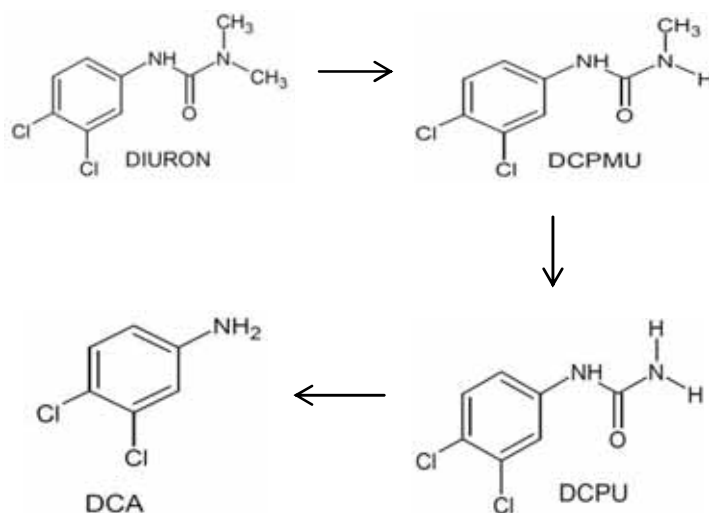
2.2 VIAS DE DEGRADAÇÃO TOXICIDADE E DO HERBICIDA DIURON

A degradação de compostos aromáticos clorados, como é o caso do diuron, é dificultada proporcionalmente pela quantidade de halogênios na molécula, os quais bloqueiam o acesso das enzimas às ligações moleculares. Muitas vezes, a mineralização completa requer etapas anaeróbias, envolvendo desalogenação reductiva (BATISSON *et al.*, 2007).

Vários microrganismos capazes de metabolizar parcialmente o diuron foram isolados (ROQUE & MELO, 2000; SORENSEN *et al.*, 2008). Entretanto, vários estudos envolvendo fungos ou bactérias apontam também a ação de biotransformação desse composto, com a formação de metabólitos mais tóxicos do que o próprio diuron (TIXIER, 2000; GIACOMAZZI & COCHET, 2004), inclusive para espécies não alvas, como os peixes. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre os efeitos desses compostos nos peixes ou em outros organismos aquáticos.

A degradação do diuron pode ser iniciada pelo processo de desmetilação, produzindo N-(3,4-diclorofenil)-N-metiluréia (DCPMU) e em seguida, a N-3,4-diclorofeniluréia (DCPU). Outro produto formado a partir da degradação do diuron é o 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) (Figura 1) (FIELD *et al.*, 1997; MELLO *et al.*, 2009).

Figura 2: Mecanismo inicial de biotransformação do diuron.



Poucos herbicidas têm sido suscetíveis à mineralização por culturas puras de microrganismos (DAMIM, 2005). Isto se deve, provavelmente, ao fato de que a maior parte dos herbicidas contém uma variedade de grupos estruturais, que requerem diferentes sistemas catabólicos enzimáticos, normalmente não encontrados dentro de um único organismo. Consequentemente, consórcios de microrganismos podem ser mais eficazes na degradação/mineralização dos poluentes do que culturas exênicas (ESPOSITO *et al.*, 1998, SMITH *et al.*, 2005).

Ainda, sabendo-se que diferentes espécies de microrganismos podem metabolizar o diuron gerando seus três principais metabólitos, o conhecimento sobre os potenciais efeitos tóxicos de cada um dos metabólitos em organismos não alvo pode auxiliar na escolha das espécies que geram aqueles metabólitos considerados menos deletérios. Nesse sentido, é necessária uma melhor compreensão dos possíveis efeitos adversos dos metabólitos do diuron para comunidades de organismos não alvo deste pesticida. (GIACOMAZZI & COCHET,; EL SEBAI *et al.*, 2004) Tais informações são de fundamental importância para se comprovar e justificar a utilidade dos processos de biorremediação do diuron por microrganismos, bem como para orientar a seleção daqueles microrganismos que formam predominantemente os metabólitos considerados menos tóxicos, ou que causem menos efeitos adversos nos peixes. (GIANFREDA *et al.*, 2006).

O herbicida diuron, assim como outras fenil uréias tem sido comprovadamente tóxico para organismos não alvos. Entre esses, organismos fotossintetizantes como cianobactéria, microalgas, aquática e terrestres tem sido um alvo indesejável desse

compostos. Em *Lemna minor*, o diuron resultou em efeito sinérgico quando presente com outros herbicidas inibidores de fotossíntese (GATIDOU *et al*, 2015), e as micro algas bêmicas estudadas por (MAGNUSSON, *et al.*, 2010). Outros protistas como *Chlamydomonas reinhardtii* também mostraram muito sensíveis aos efeitos do diuron (NESTLER *et al*, 2012).

Além dos organismos fotossintetizantes, o diuron tem sido demonstradamente tóxico para outros animais como o camarão de água fresca *Paratya australiensis* (decapoda: atyidae) (KUMAR *et al*, 2010) e ratos. O diuron afetou o sistema linfematopoiético com redução de linfócitos CD4 (DOMINGUES *et al*, 2011), além de apresentar urotoxidade em (ROCHA *et al.*, 2013)

Embora não haja evidências de mutagenicidade associada à exposição ao diuron e a teratogenicidade só tenha sido verificada com a administração de doses tão altas quanto 250 mg/kg.dia, seu principal metabólito, 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) pode induzir aneuploidias em células de mamíferos por interação com o aparelho mitótico. É ainda moderadamente tóxico para peixes e afeta a diversidade microbiana no solo (GIACOMAZZI & COCHET, 2004; EL SEBAI *et al.*, 2004).

Segundo Sanches (2014), em estudos com lambaris, a metabolização do diuron não minimiza a toxicidade. A exposição aos compostos DCA, DCPU e DCPMU alteram parâmetros bioquímicos indicadores de estresse oxidativo. Ainda que o Diuron e DCA sejam mais tóxicos ao organismo em comparação ao DCPU e DCPMU. Assim a exposição dos microorganismos a esses sub-produtos geraram mais alterações em comparação com a molécula do diuron, mostrando assim serem mais tóxicas.

Um estudo com *Gobiocypris rarus*, mostrou a exposição do organismo ao composto 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), sendo um composto altamente tóxico para o desenvolvimento do mesmo, com uma taxa de malformação observada em 12h de exposição, e após 72h uma malformação de 80% comparada com o grupo controle (ZHU *et al*, 2013).

Outro estudo feito com exposição de ratos aos metabólitos do diuron mostrou que o maior efeito citotóxico obtido foi com o DCPMU, seguidos de DCPU e DCA. Sendo um grande causador necrose e esfoliação de células, seguindo de hiperplasia de células urotelial regenerativa levando a um carcinogênese (ROCHA *et al.*, 2013)

2.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO DIURON

Os efeitos tóxicos de contaminantes ambientais podem ser estimados através de testes de toxicidade aguda, permitindo se conhecer as concentrações necessárias de cada um dos compostos para ocasionar mortandade nos peixes. Assim, aqueles compostos que apresentam letalidade em concentrações mais baixas podem ser considerados mais tóxicos que aqueles que têm o mesmo efeito somente em concentrações mais altas.

Da mesma forma, a avaliação de biomarcadores bioquímicos pode também ser útil na predição de efeitos deletérios dos contaminantes aos organismos (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Enzimas de biotransformação de xenobióticos como os citocromos P450 e enzimas de fase II como as glutatona *S*-transferases podem indicar o grau de exposição dos peixes aos contaminantes, visto que são geralmente os primeiros sistemas que respondem às intoxicações, na tentativa de metabolizar os compostos tóxicos. (HODGSON e SMART, 2001). Ainda, enzimas envolvidas em respostas ao estresse oxidativo também podem ser úteis para se predizer situações de exposição a contaminantes, uma vez que inúmeros compostos tóxicos são responsáveis pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em função do aumento do metabolismo celular, na atividade de enzimas mono-oxigenases envolvidas na biotransformação, ou devido a mecanismos ciclo-redox dos próprios contaminantes. Desequilíbrios nos sistemas de biotransformação e defesas antioxidantes em função da exposição a contaminantes ambientais contribuem sobremaneira para aumentos nos níveis de lesões às biomoléculas que podem levar o organismo a um declínio geral em sua condição fisiológica ‘

Os testes toxicológicos permitem comparar o potencial tóxico entre diversos compostos químicos, além do grau de sensibilidade de diferentes organismos (COSTA *et al.*, 2008). Com o desenvolvimento de novos protocolos para estudos toxicológicos podem-se definir concentrações limites permissíveis de determinados compostos no ambiente os quais servirão como referência para entidades reguladoras. Entretanto, a padronização desses testes é essencial, pois permite a comparação de dados e reprodução do teste (RONCO *et al.*, 2004). Diversos órgãos de proteção ambiental desenvolvem protocolos para realização de testes de toxicidade, como a Environmental Protection Agency – (EPA).

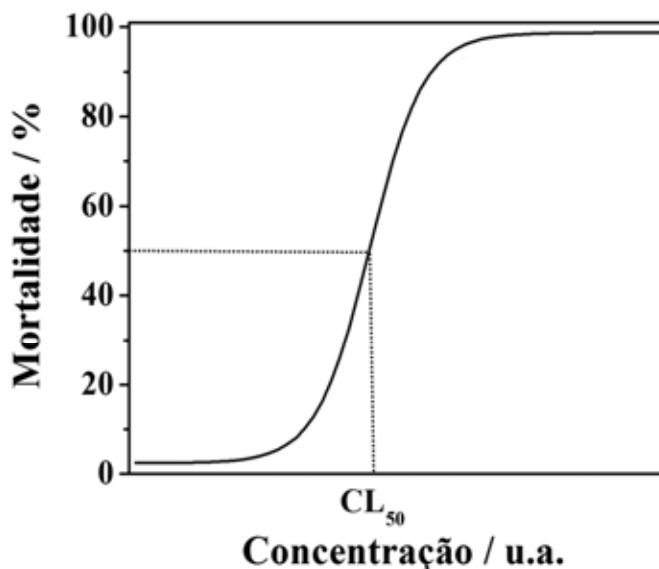
Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos. Os testes agudos são utilizados para medir o efeito de um agente tóxico sobre um organismo aquático durante um curto período de tempo, com relação ao período de vida do organismo teste. O

objetivo é estimar a dose ou concentração do agente tóxico que seria capaz de gerar uma resposta detectável, em um tempo relativamente curto de 24 a 96h. Os resultados de testes agudos são geralmente interpretados como CL_{50} (Concentração Letal Média) ou CE_{50} (Concentração de Efeito) ambos causados em 50% dos organismos testes. Os estudos de toxicidade crônica são realizados para determinar o efeito tóxico após exposição prolongada, como parte ou todo ciclo de vida do organismo (COSTA *et al.*, 2008) com doses sub-letais, mas que afetam as funções biológicas, como reprodução, desenvolvimento de ovos e estruturas reprodutivas e diferenciação sexual. Os resultados de testes crônicos são geralmente expressos como CENO (Concentração de Efeito não Observado) ou CEO (Concentração de Efeito Observado) (COSTA *et al.*, 2008).

Além do efeito na mortalidade, podem-se identificar alterações nas condições fisiológicas e/ou metabólicos dos organismos expostos, indicando o efeito deletério do composto testado. Em um teste os organismos expostos podem absorver os compostos químicos por diferentes rotas. Essa absorção pode causar efeitos sub-letais deletérios, alterações que atingem os sistemas enzimáticos de biotransformação, permeabilidade na membrana e danos ao DNA (COSTA *et al.*, 2008). A relação dose-resposta, ou seja, a concentração de um composto químico e o efeito deletério causado ao organismo é fundamental para avaliar o risco do composto no ambiente. Curvas representativas de dose-resposta são do tipo sigmoide (Figura 3), mostrando a (CL_{50}) e o coeficiente angular da parte linear da curva revelando no organismo o efeito causado (HODGSON, 2004).

Alguns métodos estatísticos foram desenvolvidos para facilitar o planejamento dos testes de toxicidade. Para analisar dados paramétricos são utilizados Probit & Logit. Porém esses métodos não conseguem avaliar eventuais anomalias e não são válidos para curvas assimétricas. Para não paramétricos, os métodos Sperman-Karber e *timmed* Sperman-Karber são os mais utilizados (COSTA *et al.*, 2008).

Figura 3: Curva sigmoide típica de relação dose-resposta em testes de toxicidade. A curva revela a concentração de uma substância capaz de matar 50% de uma população. (Adaptado de Costa *et al.*, 2008).

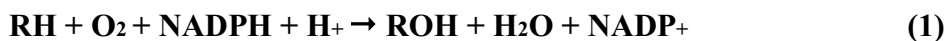


2.3.1 Enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante

Em eucariotos, várias enzimas tem papel na desintoxificação frente à exposição dos organismos aos xenobióticos. Elas atuam aumentando a solubilidade dos compostos, principalmente lipofílicos, para possa ser mais facilmente excretado ao meio, com isso pode ser utilizado como controle e avaliação dos níveis de toxicidade que um determinado xenobiótico exerce sobre um determinado organismo (HODGSON & SMART, 2001).

As vias de biotransformação dos compostos químicos podem ser divididas em três fases. Na fase I ocorrem as reações de oxidação, redução e hidrólise. Durante a fase II, ocorrem as reações de conjugação e, por último, a fase III, de excreção. Na fase I, os grupos reativos polares são introduzidos na molécula do composto gerando substratos que participarão das reações de fase II. Nessa fase I, o sistema responsável pela oxidação é o complexo multienzimático de mono-oxigenases citocromo P450 (citP450) que é um conjunto de heme-proteínas ligado a membrana do retículo endoplasmático de microsoma, principalmente de células hepáticas (GIULIO e HINTON, 2008; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A mono-oxigenação ocorre pela redução de um átomo da molécula de oxigênio formando água, enquanto o outro átomo é incorporado à molécula do substrato utilizando elétron de NADPH (Reação 1) (GIULIO & HINTON, 2008).

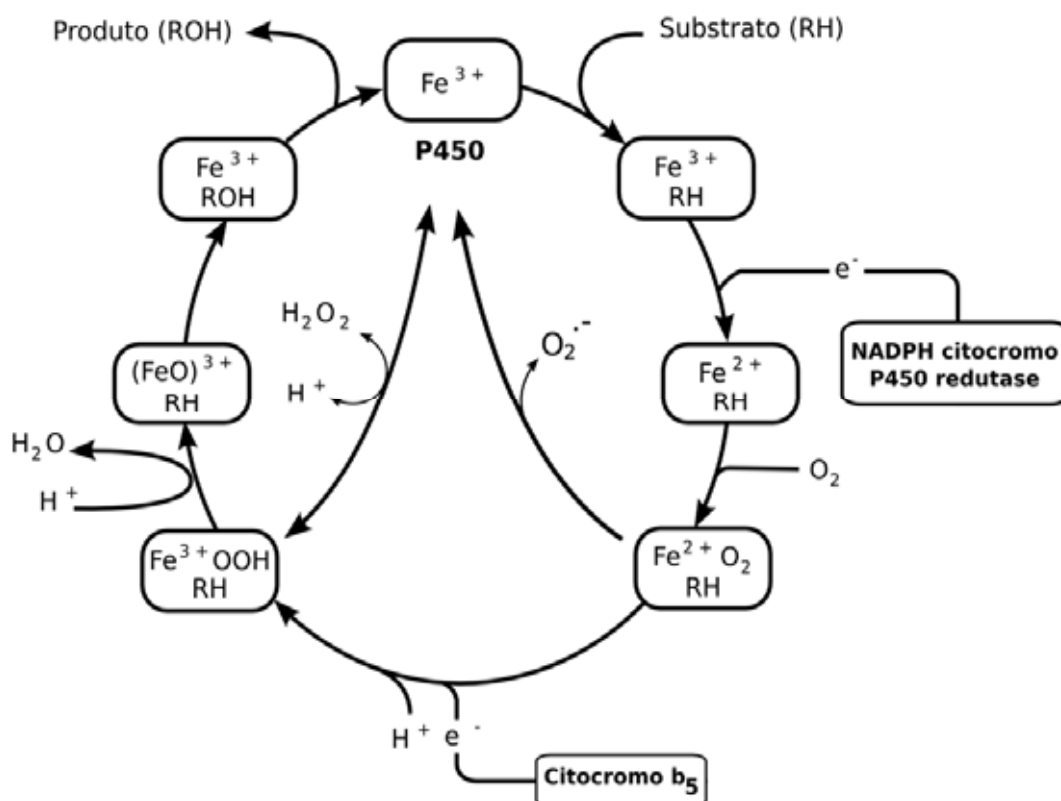


A ação dessas enzimas até que o substrato seja oxidado envolve uma série de reações. A mono-oxigenases inicia seu ciclo quando acontece a ligação do substrato ao complexo oxidado (Fe^{3+}) facilitando na transferência de elétrons do NADPH ao complexo (Figura 4).

Após a ligação do oxigênio ao complexo, agora reduzido (Fe^{2+}), ocorre a transferência do segundo elétron pela ação da enzima mediadora citocromo b5 redutase. Após esse processo, ocorre a clivagem da ligação de átomos da molécula de oxigênio. Finalmente a molécula de oxigênio é inclusa no substrato, para posterior dissociação do substrato mais hidrófilo solúvel e no complexo se inicia um novo ciclo (Figura 4).

As enzimas do complexo multienzimático P450 possuem diversas isoforma entre elas a (CYP1A). A isoforma 1 (CYP1A) deixa o composto mais hidrófilo, catalisando sua reação de ligação de um pequeno grupo polar com o composto para ser facilmente descartado do organismo, em especial a etoxiresorufina *O*-deetilase (EROD). Essas isoformas desempenham um papel muito importante na biotransformação de compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aroáticos (HPAs).(NOGUEIRA, 2008).

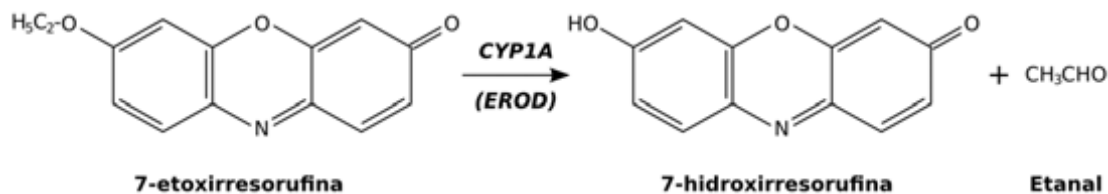
Figura 4: Ciclo catalítico do p450 para metabolizar o xenobiótico em um substrato solúvel envolvendo reações de oxirredução com a participação do NADPH como doador de elétrons e da enzima citocromo b5redutase como mediadora, formando uma molécula de água (Adaptado de NOGUEIRA, 2008).



A 7-etoxirresorufina-*O*-deetilase (EROD) é utilizada para verificar a atividade catalítica da isoforma CYP1A. É uma análise de um método cinético medindo a *O*-desalquilação do substrato não fluorescente 7-etoxirresorufina em um material fluorescente, a resorufina (Figura 5).

Em alguns organismos aquáticos como peixes a CYP1A é responsável pela biotransformação de vários compostos, como por exemplo, os HPA, PCB e dioxinas. Estudos revelam que a exposição ao HPAs causa um aumento da CYP1A. Assim, um grande biomarcador muito sensível de exposição a esse poluente é a EROD (WHYTE *et al.*, 2000).

Figura 5: Mecanismo de ação da EROD sobre o substrato 7-etoxirresorufina. (Adaptado de WHYTE *et al.*, 2000).



O Metabolismo de detoxificação na fase II ocorre envolvendo as reações de conjugação e a ligação de um composto a um grupo ligante endógeno, como por exemplo, ácido glucurônico e glutatona, formando assim uma ligação muito solúvel em água, facilitando a excreção (HODGSON & SMART, 2001). As glutatona S-transferases (GST) são enzimas encontradas na fase II do metabolismo de desintoxicação que protege o organismo contra efeitos altamente tóxicos de compostos endógenos. Encontradas no citosol das células, catalisam a reação de conjugação de glutatona reduzida (GSH) com substratos eletrofílicos (HODGSON & SMART, 2001).

2.4 MARCADORES GENOTÓXICOS

São utilizados para avaliar os níveis de danos que um determinado organismo sofreu em seu material genético, como alteração química, a mutagênese, ou alteração do determinismo genético como carcinogênese e teratogênese. (Silva *et al.* 2003, Silva *et al.* 2007). Uma das técnicas mais utilizadas para avaliação da genotoxicidade é o teste do cometa, que consiste numa técnica de alta sensibilidade que avalia os danos causados ao DNA de células individuais possibilitando a quantificação da quebra de fitas, detectando assim lesões pré-mutagênicas. (KAMMANN *et al.*, 2001).

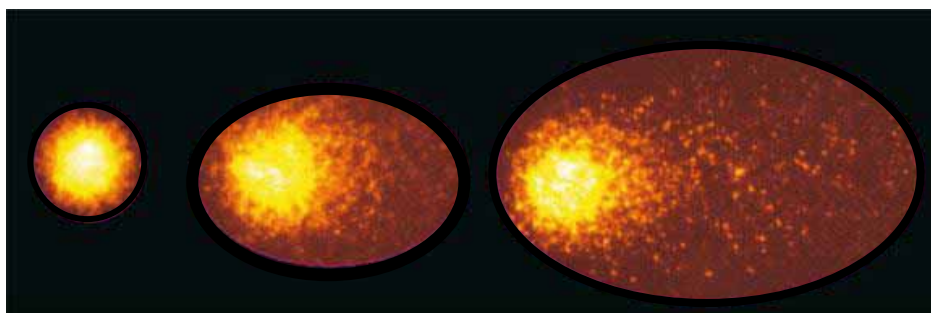
Esse tipo de ensaio vem sendo muito útil na identificação de contaminantes em recursos hídricos, utilizados em eritrócitos de peixes. Esse ensaio apresenta alto nível de detecção, não somente quebras de fitas, as quais geram as aberrações cromossômicas, mas também modificações nas bases do DNA, como sítios apurínicos e apiridinídicos uma das principais causas de indução a mutações. (SAMPAIO *et al.*, 2012).

Desenvolvida por Ostling e Johanson em 1984, uma técnica de eletroforese em gel com única célula (Single Cell Gell Eletroforese – SCGE) mais conhecida como ensaio do cometa, em que as células são englobadas em gel de agarose, espalhadas por uma lâmina de microscopia, anteriormente lisadas por detergentes e submetidas a corrente elétrica, em pH neutro. A ação da corrente age proporcionando o deslocamento dos segmentos de DNA livres, resultantes das lesões, em direção ao ânodo, devido a esse arraste a imagem lembra a imagem de um cometa, por isso motivo seu nome.

Esse procedimento em pH neutro limita a aplicabilidade do ensaio, pois somente as duplas quebras serão observadas. Porém, em condições mais alcalinas, podem também serem observadas as quebras de cadeias simples, aumentando a eficiência, resolução e abrangência do teste. (SINGH *et al.*, 1988).

Para a quantificação dos cometas, as lâminas preparadas são coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência. Células com núcleos unidos são considerados normais, células com um arraste simulando um “cometa” são consideradas lesionadas, devido a fragmentação do DNA.

Figura 6: Avaliação dos níveis de lesões por meio da eletroforese em gel de célula única (ensaio do cometa) a: célula normal b: célula com lesão média c: célula com lesão grave. (Adaptado de RIBEIRO *et al.*, 2007).



Para a quantificação dos cometas, as lâminas são coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência. Células com núcleos em forma de círculo são considerados normais, porém células que apresentam um arraste, com uma cauda aparentando um “cometa” formada pelos fragmentos de DNA são consideradas células lesadas.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto foi avaliar o potencial de degradação do herbicida diuron por bactérias isoladas de solo de plantação de cana-de-açúcar e verificar os potenciais efeitos adversos desses metabólitos sobre uma espécie de peixe endêmica da América latina (lambaris, *Astyanax altiparanae*).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar as cepas bacterianas em meio líquido contendo diuron e avaliar os níveis de degradação;
- Realizar ensaios de degradação do diuron pelas cepas selecionadas em microcosmos usando os solos contaminados com esse herbicida;
- Avaliar a toxicidade do diuron em biomarcadores bioquímicos e genotóxicos de peixes (*Astianax sp.*) e, comparativamente, verificar se as misturas de metabólitos do diuron gerados após as fermentações com as bactérias, fazem com que os efeitos deletérios diminuam para os peixes expostos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CEPAS BACTERIANAS

As bactérias utilizadas neste projeto são provenientes da coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA), da UNESP de São José do Rio Preto, SP. As cepas (Tabela 1) foram isoladas de solo de cultivo de cana-de-açúcar, que possui histórico de aplicação de herbicida desde 2009, nas propriedades de plantio da Usina Açucareira Virgolino de Oliveira S/A (Unidade José Bonifácio), situada na cidade de José Bonifácio-SP (Área- FA 30654, Latitude- 610916, Longitude-7662950).

Tabela 2: Bactérias selecionadas para desenvolvimento do projeto.

	Cepa	Característica morfológica
1	TG1.41	Coco Gram +
2	<i>Lysinibacillus</i> sp TG1.37	Coco Gram +
3	TD1.10	Coco Gram +
4	<i>Klebsiella oxytoca</i> TD1.46	Coco Gram -
5	TG2.31	Coco Gram -
6	TG2.38	Coco Gram +
7	TD2.18	Bastonete Gram -
8	<i>Leucobacter</i> sp TG3.14	Bastonete Gram -
9	<i>Delfitia</i> sp TD3.31	Bastonete Gram +
10	TG4.48	Coco Gram +
11	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> TD4.7	Bastonete Gram -
12	TD4.31	Coco Gram -
13	<i>Pseudomonas</i> sp TD4.43	Coco Gram +

4.2 CULTIVO PARA AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO DIURON EM MEIO SÓLIDO

As bactérias foram cultivadas em meio Plate Count Agar (Himedia) contendo 10 mg/L⁻¹ de diuron, mesma concentração encontradas nos locais de isolamento. O diuron foi previamente suspenso em metanol e acrescentado ao meio após este ser autoclavado.

4.3 DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO DIURON EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.3.1 Crescimento da bactéria referencia em meio com diuron

O primeiro experimento em fermentação submersa foi realizado utilizando a bactéria *K. oxytoca* TD1.46 para padronização da metodologia, uma cepa com grande

capacidade de degradação após seu isolamento. Foi utilizado o meio de Dellamatrice e Monteiro (2004), com modificações: 0,6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,15% KH_2PO_4 ; 0,05% KCl ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $10^{-4}\%$ FeSO_4 ; $10^{-4}\%$ ZnSO_4 , 0,05% glicose em pH 6,8, em cultivo de 9 dias, a 30°C retirando alíquotas a cada 24h. O estudo da degradação do diuron acrescentando-se 4mg/L do mesmo ao meio.

4.3.2 Avaliação do efeito da glicose sobre a degradação do diuron

Considerando que a glicose poderia interferir, positiva ou negativamente, na degradação do diuron, aumentou-se a concentração da glicose em 10x, utilizando o meio proposto por Sharma *et al.* (2010), com modificações: 0,06% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,20% KH_2PO_4 ; 0,08% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $10^{-4}\%$ FeSO_4 ; $10^{-4}\%$ ZnSO_4 , 0,5% glicose em pH 6,8.

4.3.3 Planejamento experimental Plackett-Burman (PB) para avaliação do efeito da composição nutricional do meio de cultivo sobre a degradação do diuron

Visando avaliara o efeito do aumento da concentração de glicose e nutrientes no meio sobre a capacidade de degradação do diuron pelas bactérias, foi realizado um planejamento experimental para avaliar o efeito do enriquecimento do meio com nutrientes minerais.

O planejamento experimental foi realizado de acordo com o modelo de Plackett-Burman (PB) usando meio basal de ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 1,0 KH_2PO_4 ; 2,0 Na_2HPO_4 ; 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 NaCl ; 0,5 Triton X-100 e 1 mL de elementos traços (0,05 KI ; 0,05 LiCl ; 0,1 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,0 H_3BO_3 ; 0,1 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,05 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,1 CuSO_4 ; 0,02 FeSO_4). Acrescentou-se ao meio basal 3 concentrações diferentes de glicose (0; 0,1 e 0,2%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,3; 0,6 e 0,9 %) e mix de vitaminas (0; 0,5; 1,0 %), em três diferentes ph (6,5; 7,0; 7,5), como mostra a tabela 3. O mix de vitaminas foi composto por ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$): 2,0 biotina; 2,0 ácido fólico; 5,0 cloridrato de tiamina; 5,0 ácido nicotínico; 5,0 patotenato de cálcio; 10,0 piridoxina; 5,0 ácido fólico e 0,1 vitamina B12.

Tabela 3: Planejamento Experimental: Modelo Plackett-Burman (valores em %).

Experimento	Glicose	pH	Vitamina	Nitrogênio
1	0,20	6,5	0,00	0,90
2	0,20	7,5	0,00	0,30
3	0,20	7,5	1,00	0,30
4	0,00	7,5	1,00	0,90
5	0,20	6,5	1,00	0,90
6	0,00	7,5	0,00	0,90
7	0,00	6,5	1,00	0,30
8	0,00	6,5	0,00	0,30
9	0,10	7,0	0,50	0,60
10	0,10	7,0	0,50	0,60
11	0,10	7,0	0,50	0,60
12	0,10	7,0	0,50	0,60

4.4 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE DIURON PELAS CEPAS EM CULTIVO SUBMERSO

As 13 linhagens bacterianas (Tabela 2) foram cultivadas conforme descrito a seguir. A fermentação submersa foi realizada em erlenmeyers de 125 mL, contendo 30 mL do meio de sais descrito anteriormente, acrescido de 10 mg.L⁻¹ do herbicida diuron. O inóculo foi preparado por suspensão de células em solução salina (meio Dellamatrice e Monteiro, 2004) obtida em pré-cultivo. Dessa suspensão foi utilizado 0,5 mL (amostra com DO600 ≈0,6) para inocular 30 mL de meio. Os erlenmeyers foram incubados a 30°C, 100 rpm por 48h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 4 min a 10000 g. O sobrenadante foi utilizado para avaliação do potencial de degradação do herbicida diuron.

4.5 CONSÓRCIO DE MICROORGANISMOS

Foi utilizado cepas que foram capazes de degradar o diuron, as cepas cultivadas em consórcio com fungo filamentoso, obtido da coleção do LBMA (Tabela 4), isolado durante um trabalho de mestrado sobre degradação de compostos de tinta residencial. (BARBOSA, 2013). Este fungo foi escolhido após um teste de crescimento em placa contendo diuron como fonte de carbono.

A fermentação submersa foi realizada em erlenmeyers de 125 ml, contendo 30 ml do meio de saís descrito anteriormente, acrescido de 10 mg.L⁻¹ do herbicida diuron. O inóculo foi preparado por suspensão de células em solução salina (meio Dellamatrice e Monteiro, 2009) obtida em pré-cultivo.

Dessa suspensão foram utilizados 0,5 ml da solução fúngica e bacteriana, para inocular 30 ml de meio. Os erlenmeyers foram incubados a 30 °C, por 120h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 18800 g. O sobrenadante foi utilizado para avaliação do potencial de degradação do herbicida e a formação de outros produtos.

Tabela 4: Microorganismos selecionados para desenvolvimento do consórcio.

Cepas	Característica Morfológica
<i>Lysinibacillus sp</i> TG1.37	Coco Gram +
TD 1.10	Coco Gram +
TG 2.31	Coco Gram -
<i>Leucobacter sp</i> TG3.14	Bastonete Gram -
<i>Pseudomonas</i> TD4.43	Coco Gram +
<u>Fungo</u>	
<i>Mortirella alpina</i>	

4.6 ENSAIO DE MICROCOSMOS

4.6.1 Coleta do solo

Nesse trabalho foi utilizado um solo, coletado na rodovia municipal Unnamed, no município de Buritama-SP com acesso a SP-461 535,5km de São Paulo (5.21°03'02.4''S 50°10'35.2''W) no mês de Dezembro de 2014, de uma área de cultivo de cana-de-açúcar com histórico da aplicação do herbicida diuron. Esse solo é característico do estado de São Paulo e por isso foi estudado no ensaio de biorremediação com herbicida diuron.

A coleta foi feita a 10 cm de profundidade para evitar a lixiviação, rochas e restos orgânicos de cana-de-açúcar. Logo após a coleta o solo foi tamisado grosseiramente para retirar partículas de pedras e outras matérias orgânicas como, pedras e palhas.

O solo foi condicionado em sacos plásticos de polietileno recuperado, após o transporte para o laboratório o saco foi armazenado até o momento do uso na câmara fria em temperatura de 1 °C, visando evitar a atividade microbiótica. Antes da utilização o solo foi levado a estufa a 50 °C de circulação de ar para retirar umidade.

4.6.2 Preparo do Pré-inóculo

Para o preparo do pré-inóculo foram utilizadas além das bactérias que constam na tabela 4, a bactéria TG 2.38, uma vez que todas foram capazes de degradar o diuron. As cepas foram, então inoculadas em erlenmeyers de 125 mL com 30 ml de meio Dellamatrice et al. 2004, com modificações, incubados a 30 °C por 48 h. 18800 g

4.6.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi feito em erlenmeyers de 120 mL com 20 g de solo, enriquecido com N,P,K; umidade de 30% , acrescido de 10 mg/g de solo de herbicida diuron diluído em metanol PA. Posteriormente foi inoculado 1 mL do pré-inóculo DO 660 nm com as cepas selecionadas descrito a cima, incubado a 30 °C durante 120 horas.

Após o período de incubação o solo foi passado para um tubo de fundo cônico de 50 ml com adição de 10 ml metanol PA. para suspensão e extração do composto, centrifugado a 18800 g, por 15 min. a 5 °C.

Uma alíquota de 2 mL foi retirada, filtrado em membranas Millex em polietileno de 0,22 µm de poro, não estéril e analisado em HPLC-UV para obtenção do resultante e identificação de subprodutos.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

A degradação do herbicida e o surgimento dos primeiro metabólitos foram avaliados em HPLC acoplado a um detector coulométrico eletroquímico (Perkin Elmer Model Flexar). Antes de injetadas, as amostras foram filtradas em filtros Millex em polietileno de 0,22µm de poro, não estéril. As condições da análise em HPLC foram: 3 µL de volume injetado de amostra; Coluna PerkinElmer C18 (Coluna Brownlee Analytical C18 – 100 mm x 2,1 mm x 1,9 µm); Tempo de corrida de 6 minutos; Eluição Isocrática contendo como fase

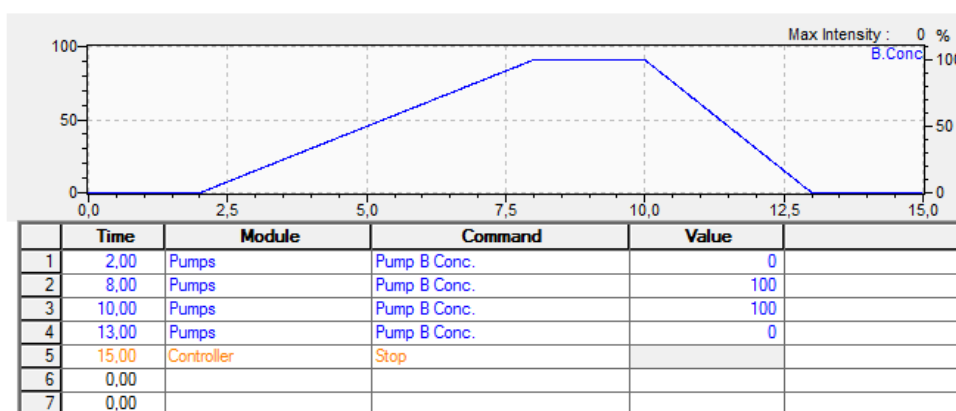
móvel Água:Acetonitrila (60/40 v/v); Fluxo de 0,25 mL/min; Detector UV ajustado a 240nm, forno a 45°C e tempo de corrida de 5 min.

As análises realizadas em espectrômetro de massa (MS) foram feitas para confirmação da presença dos metabólitos de interesse, encontrados previamente por HPLC. Antes de realizar a injeção das amostras no Massa, as mesmas foram submetidas à extração em fase sólida (SPE) para purificação e concentração dos metabólitos. A SPE foi realizada de acordo com Gatidou et al. (2005), com modificações, e o condicionamento dos cartuchos polimérico (Oasis HLB, 60mg) foi realizado de acordo com procedimento do fabricante (Waters-OASIS).

Um volume de 50 mL de amostra filtrada foi utilizado na extração SPE. A separação dos picos do diuron e seus prováveis metabólitos foi realizado off-line, utilizando-se cartuchos poliméricos montados em Manifold (SUPELCO -12 amostras) acoplado a bomba a vácuo (MARCONI). Os cartuchos foram condicionados por 3 mL de MeOH e 3 mL de água ultrapura. As amostras percorreram o cartucho com um fluxo de aproximadamente 6mL.min⁻¹. A fim de eliminar os sais, os cartuchos foram lavados com 3 mL de água ultrapura, em seguida, seco ao ar durante 1 minutos. Os compostos foram eluídos com 5 mL do solvente orgânico (MeOH, PA).

As amostras foram analisadas no Laboratório Thom|Son da Unicamp, utilizando o equipamento Shimadzu, LCMS-8040. As condições das análises foram: Fase móvel B: Metanol sem aditivo e A: Água sem aditivo (gradiente na figura 7), Coluna C18 Shim-pack XR-ODS III 150Lx 2.0; 2.2 µm, fluxo de 0,3 ml por min e tempo de corrida de 15 minutos.

Figura 7: Gradiente da fase móvel: (B) Metanol sem aditivo.



4.8 TESTES DE TOXIDADE EM PEIXES

4.8.1 Organismo Teste

Neste estudo foram utilizados peixes da espécie *Astyanax altiparanae*, da família *Characidae* popularmente conhecidos como lambaris (Figura 8). Esta espécie é encontrada rios e lagoas do Brasil, possuindo grande adaptabilidade a diferentes habitats e é sensível a mudanças em seu ambiente natural, mostrando ser um bom organismo para o uso em estudos de biomonitoramento, apesar de serem praticamente inexistentes estudos ecotoxicológicos nessa espécie.

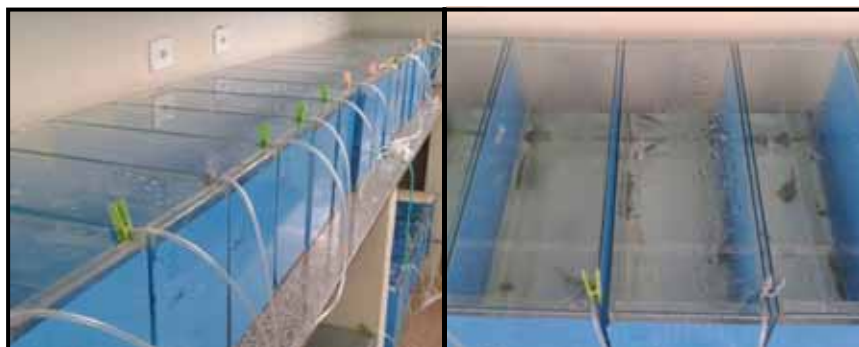
Figura 8: Espécime de peixe *Astyanax altiparanae*, conhecido como lambari. (SANCHES, 2014).



Os peixes foram adquiridos no comércio de iscas em São José do Rio Preto, SP. Após o período de uma semana de aclimação as condições do laboratório, os mesmos foram aclimatados nos aquários experimentais de 40 x 24 x 19 cm (~10 Litros), mantidos em aeração constante (Figura 9) por sete dias antes de começarem os testes. O peso dos peixes variou de 7,0 a 10 g e o tamanho ficou entre 6,5 e 8,0 cm. Cada grupo experimental foi constituído de cinco aquários (N=5 por tratamento), contendo dois peixes em cada. Após um período de uma semana de aclimação em tanques de laboratório, os animais foram expostos aos tratamentos durante 7 dias.

Os lambaris foram alimentados diariamente durante o período de aclimação e foi mantida a temperatura 28 °C e aeração constante. Durante os períodos de exposição os peixes foram alimentados diariamente com pequenas porções e retirando excesso.

Figura 9: Aquários experimentais.



4.8.2 Exposição dos peixes ao diuron e seus metabólitos para análises de biomarcadores bioquímicos.

4.8.2.1 Obtenção do extrato de cultivo da bactéria

Foram preparados meios de cultura contendo 10 mg L^{-1} de diuron o qual foi inoculado com a bactéria TG 3.14 e cultivado por 72h, a 30°C , 130 rpm. Após esse período, o meio foi centrifugado a $10000 \times g$ por 10 min e filtrado em papel Whatman nº1. Nesse filtrado foram quantificados o diuron residual e os metabólitos DCPU, DCPMU e DCA e utilizado nos testes de toxicidade em peixes sendo utilizada a concentração de diuron residual como referência para a definição da quantidade de filtrado a ser adicionado à água dos aquários.

4.8.2.2 Teste de toxicidade

Após um período de aclimação de uma semana em tanques de laboratório, os peixes foram colocados nos aquários e receberam os tratamentos com o diuron e meio de cultura e mantidos por 7 dias em exposição. No total, o experimento contou com 6 grupos experimentais (60 peixes), conforme abaixo:

Grupo I – Controle: sem adição de meio de cultura;

Grupo II – Tratamento com meio de cultura do controle abiótico (sem inóculo da bactéria) diluído até concentração de diuron de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$;

Grupo III – Tratamento com meio de cultura do controle abiótico (sem inóculo da bactéria) diluído até concentração de diuron de $0,015 \text{ mg L}^{-1}$;

Grupo IV – Tratamento com meio de cultura fermentado pela bactéria *Leucobacter* sp TG3.14 diluído até concentração de diuron residual de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$;

Grupo V – Tratamento com meio de cultura fermentado pela bactéria *Leucobacter* sp TG3.14 diluído até concentração de diuron residual $0,015 \text{ mg L}^{-1}$;

Grupo VI – Recebeu o tratamento com meio de cultura abiótico sem adição de diuron

Após o período de 7 dias de exposição, os animais foram coletados, anestesiados por imersão em água contendo anestésico, pesados. Em seguida, foi feito um corte ventral nos animais para retirada do fígado para análise de EROD.

4.8.3 Descarte de resíduos tóxicos e água contaminada

Após o término dos experimentos, a água contaminada passou por um tratamento de filtros de carvão ativado para retenção de resíduos tóxicos para assim ser descartado no ambiente. Todos resíduos químicos descartados durante o experimento foram armazenados em recipientes apropriados e encaminhados para o setor de coleta de resíduos químicos do Instituto, para posterior remoção e destinação adequada.

4.9 ENSAIO DO COMETA

4.9.1 Preparação das lâminas

Foi retirado sangue dos organismos pela veia caudal com seringas de insulinas. Uma gota de sangue diluída em $1000 \mu\text{L}$ de solução fisiológica. Em lâminas previamente gelatinizadas com agarose comum adicionou-se $10 \mu\text{L}$ da suspensão celular e $120 \mu\text{L}$ de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C . As lâminas permaneceram em solução de lise (1 ml de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, para 1 L) na geladeira por uma hora. Após o processo de lise celular, as lâminas foram transferidas por uma cuba horizontal de eletroforese. Para as corridas, acrescentou-se solução alcalina (NaOH 300 mM EDTA 1 mM – pH13), por 20 minutos, na ausência de luz. Após o período de relaxamento, as lâminas foram neutralizadas com solução Tris 0,4 M, por 15 minutos e fixadas em etanol por mais 10 minutos. Após a secagem, as lâminas foram armazenadas na geladeira para posterior análise.

4.9.2 Análise das lâminas

Para análise das lâminas, a coloração foi realizada com brometo de etídeo (0,02 mg/ml) Para cada peixe foram feitas duas lâminas e foram analisados 100 nucleóides (50 em cada), com a utilização de microscopia de fluorescência, filtro B – 34 (excitação: $\lambda = 420 - 490$ nm, barreira: $\lambda = 520$ nm), em objetiva de 40x.

As nucleóides foram classificados pelo programa Comet Imager V2.2.1 de acordo com o comprimento total do cometa, indicando assim os níveis de lesões para cada núcleo.

4.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.10.1 Preparo das amostras para as análises da enzima EROD

Os fígados foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,5 (TRIS-HCl 0,2M; EDTA 1mM; DTT (DL-Ditiotreitol) 1mM; Sacarose 0,5M e KCl 0,15M) a uma proporção 1:4, massa:vol e contendo 0,00523g de inibidor de protease (PMSF) 1M. Posteriormente foram centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos. O microssoma foi ressuspenso em tampão de Tris-HCl 0,1M; pH 7,5 (TRIS HCl 0,1M; EDTA 1mM; DTT 1mM e KCl 0,1M A porção sobrenadante foi coletada e centrifugada a 50.000 x g por uma hora obtendo assim a fração citosólica e microssomal. A fração microssomal foi utilizada para medição da atividade da enzima EROD.

4.10.2 Análise da atividade da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade da EROD foi medida em leitor de microplacas por método fluorimétrico na fração microssomal dos extratos proteicos. O método consiste na formação de resorufina, que é fluorescente (excitação = 537 nm, emissão = 583 nm), catalisada pela EROD. Foram adicionados aos poços tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4, além de solução de 7-etoxiresorufina 335 μ M, NADPH 10 mM e extrato microssomal. A reação foi observada por 5 min, a 30°C. Os resultados estão expressos em pmol/min/mg de proteína.

4.10.3 Análise de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976) em leitor de microplacas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS PRELIMINARES

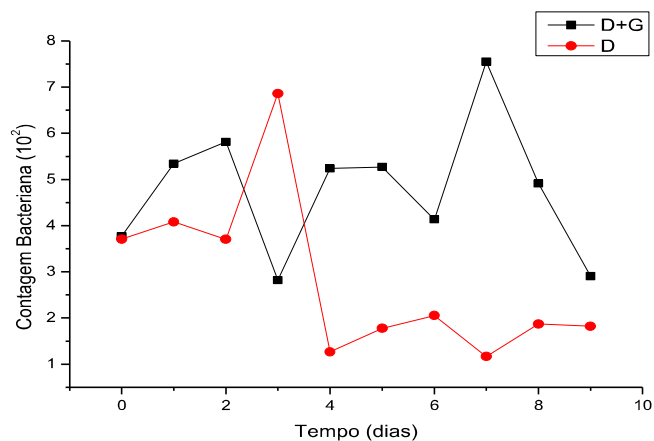
Nos experimentos iniciais de fermentação submersa realizados com a bactéria *K. oxytoca* TD1.46, observou-se que essa bactéria é capaz de utilizar o diuron como fonte de carbono. (Figura 10A).

O crescimento bacteriano foi maior em meio contendo Glicose e Diuron. Esses resultados foram diferentes daqueles obtidos por Roque e Melo (2000) que estudando o crescimento cinético da bactéria *Acinetobacter baumannii*, em meios com e sem fonte de nitrogênio, com e sem glicose (0,5%) e suplementados com diuron nas concentrações 20, 50 e 100 mg.L⁻¹, observaram que a glicose não estimulou o crescimento e degradação do diuron.

No presente trabalho nota-se que o crescimento celular ocorreu por até 7 dias em meio com glicose e diuron enquanto no meio contendo somente o diuron, a bactéria cresceu exponencialmente até o 3º dia de cultivo, seguido de uma acentuada diminuição no número de células, sugerindo que houve esgotamento da fonte de carbono e lise celular (Figura 10A).

A avaliação da degradação do diuron, considerando-se os teores residuais desse herbicida, determinados por técnicas de HPLC, mostra que a maior degradação do diuron ocorreu em meio com glicose, porém, após a exaustão desse açúcar do meio sugerindo uma diauxia, ou seja, a bactéria reinicia o crescimento pelo consumo do diuron (Figura 10B). Constatou-se que a bactéria *K. oxytoca* TD1.46 foi capaz de degradar até 18% do diuron do meio em 48h, o que corresponde 0,48mg/L. Posteriormente, em novos testes com a cepa citada acima, a mesma perdeu sua capacidade de degradação do composto diuron.

a)



b)

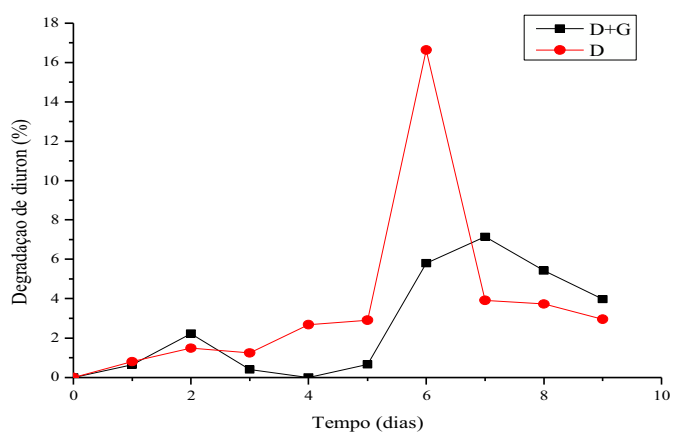
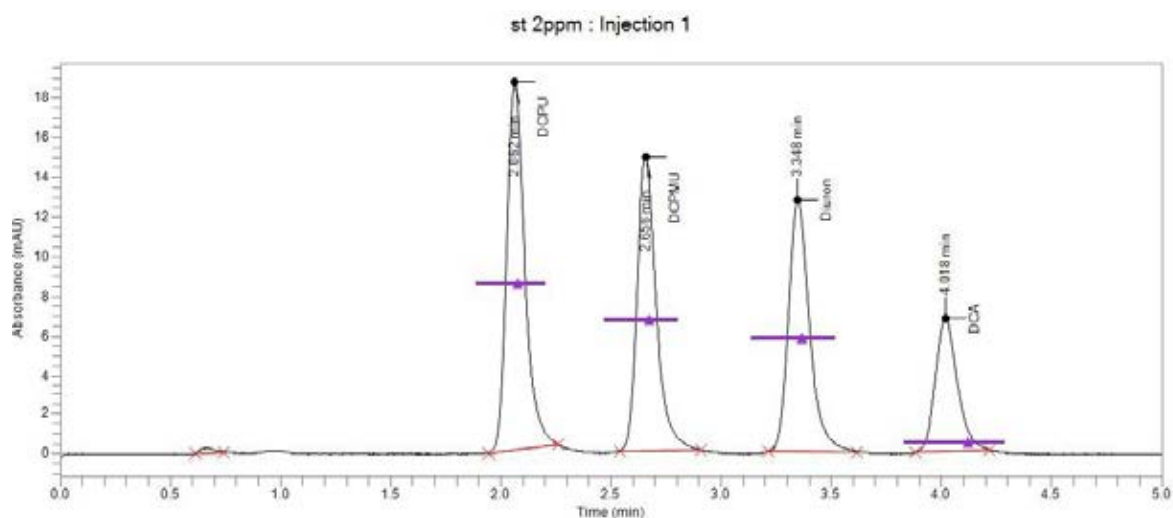


Figura 10: Crescimento da população *Klebsiella oxytoca* TD1.46 (a) e degradação do diuron (b) em meio líquido (●) na ausência e presença de glicose (■).

5.1.1 Análise dos metabólitos derivados do diuron em meio de cultivo de *K. Oxytoca* TD 1.46

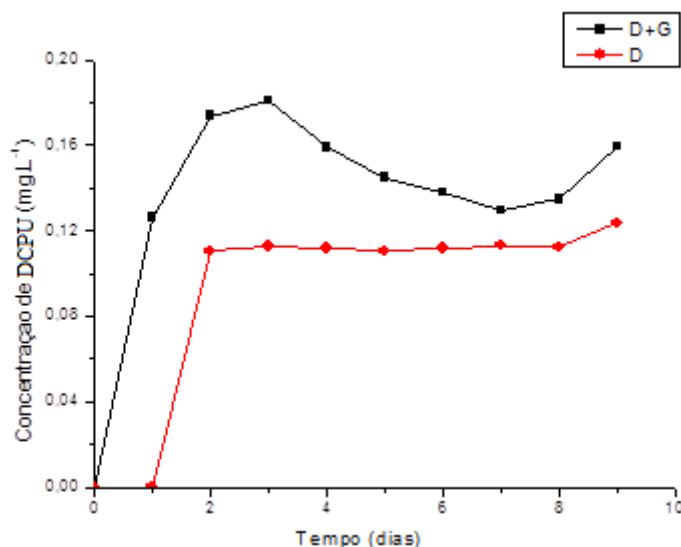
Como padrão analítico foram utilizadas soluções de diuron em concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg.L^{-1} e de DCPMU, DCPU e DCA (Aldrich Chemistry). Os tempos de retenção obtidos para os padrões de diuron, e dos três metabólitos encontram-se na Figura 11.

Figura 11: Tempo de retenção dos padrões analíticos de Diuron, DCPMU, DCPU e DCA.

Peak #	RT (min)	Component Name	Area	Height	BL	Final Amount	Units
1	0.667		1,044.9	247.1	BB		
2	2.062	DCPU	105,564.9	18,614.5	BB	1.9615	ppm
3	2.656	DCPMU	90,249.6	14,890.4	BB	2.0101	ppm
4	3.348	Diuron	83,735.5	12,746.3	BB	2.0362	ppm
5	4.018	DCA	46,965.1	6,762.0	BB	2.9026	ppm
Total			327,560.0			8.9104	

No meio de cultivo da *K. oxytoca* TD 1.46, foi detectada a presença do DCPU e não foram detectados os metabólitos DCPMU e DCA (Figura 12). A presença de apenas o primeiro metabólito da via de degradação do diuron sugere que a bactéria pode não ter potencial enzimático para a continuidade da sequência de reações de demetilação descritas para essa via ou que o tempo de incubação pode ter sido muito curto. A concentração do metabólito DCPU foi maior no meio contendo glicose, corroborando os dados anteriores.

Figura 12: Concentração de DCPU formada ao longo do cultivo da bactéria *K. oxytoca*.



5.1.2 Avaliação do aumento da concentração de glicose na degradação do diuron pelas cepas bacterianas

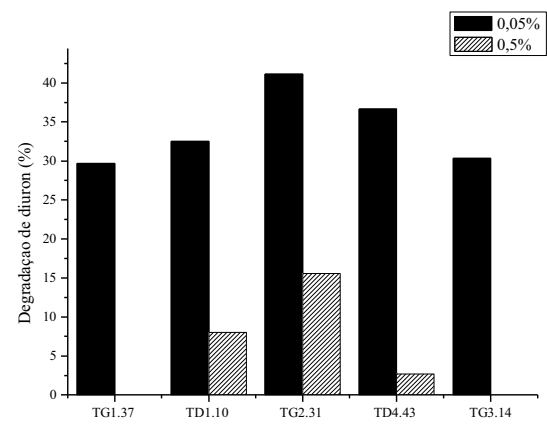
Uma vez definida a metodologia, iniciou-se os ensaios com as cepas relacionadas na Tabela 2. Nesses ensaios, foram utilizadas concentrações de 0,5 e 0,05% de glicose no meio, considerando que os ensaios preliminares indicaram efeito positivo da presença desse açúcar sobre a degradação do diuron e os cultivos ocorreram por 48h, a 140 rpm, 40°C.

A Figura 13 mostra que todas as cinco cepas TG1.37;TD1.10;TG2.31;TD4.43 e TG3.14 foram capazes de degradar o diuron com valores de degradação do herbicida variando de 30 a 40% (Figura 13a).

O efeito positivo da glicose foi observado quando esta encontrava-se em concentração de 0,05% visto que concentração de 0,5% reduziu drasticamente a degradação do herbicida. A análise da Figura 13b indica que não houve degradação do diuron enquanto as bactérias consumiam glicose.

Figura 13: Degradação de diuron (a) e consumo de glicose (b) pelas bactérias selecionadas na presença de 0,05 e 0,5% de glicose, em 48h de cultivo.

a)



b)

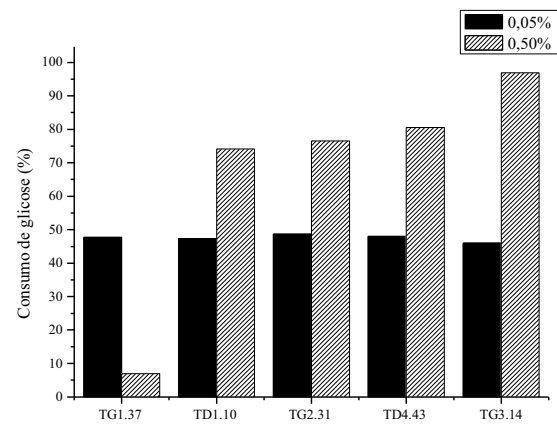
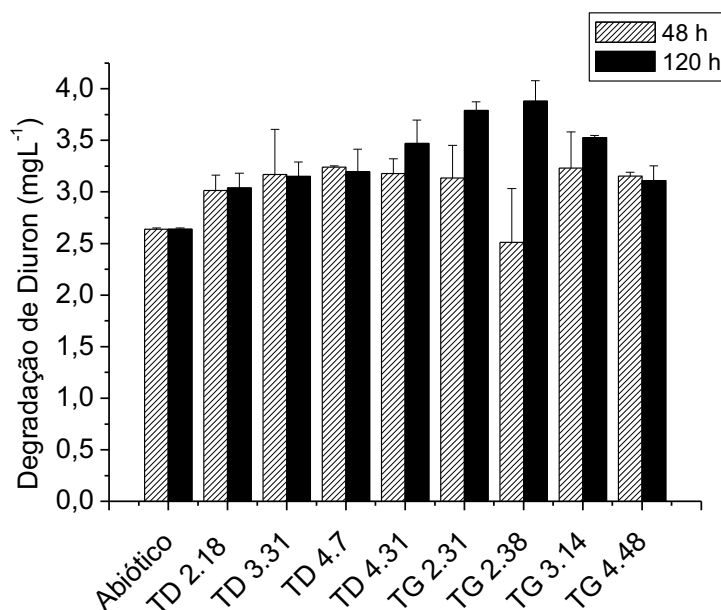


Figura 14: Degradação de diuron (a) e consumo de glicose (b) pelas bactérias selecionadas na presença de 0,05 % de glicose, em 48 h e 120 h de cultivo.



Nos ensaios com 0,05% de glicose houve total consumo desse açúcar enquanto um meio com 0,5% foi consumido 96% indicando que as cepas utilizam o diuron como fonte de carbono após a glicose ser exaurida do meio (Figura 12b). O efeito positivo observado pode estar relacionado com o total de biomassa produzida e aceleração das fases lag e log induzidas pela glicose, por outro lado, quando a glicose está presente no meio é assimilada preferencialmente e pode estar exercendo repressão sobre as enzimas envolvida na metabolização do diuron.

Vários autores mostraram a interferência da glicose na degradação do diuron. Sharma e colaboradores (2010) realizaram experimentos de degradação de diuron em meio contendo 0,5% de glicose e obtiveram 96% de degradação de diuron pela bactéria *Micrococcus* sp. PS-1. Batisson *et al.* (2007) realizaram experimentos de degradação na ausência de glicose com bactérias isoladas de ambiente lótico e observaram a degradação de 25, 30, and 60% quando utilizado 20, 10, and 2 mg.L⁻¹ de diuron.

Visando ampliar o número de bactérias estudadas e a partir desse dados, novos experimentos foram realizados com outras bactérias de coleção e utilizando 0,05% de glicose.

5.1.3 Detecção do metabólitos liberados no meio de cultivo por degradação do diuron

Para o cultivo das cinco cepas TG1.37; TD1.10; TG2.31; TD4.43 e TG3.14 foram utilizados os meios contendo 0,05% e 0,5% de glicose. A figura 15 mostra que todas as cepas foram capazes de produzir o metabólito DCPMU com maior frequência em meio com menor concentração de glicose, enquanto que as cepas TD4.43 e TG3.14 produziram esse metabólito em meio com 0,5% de açúcar.

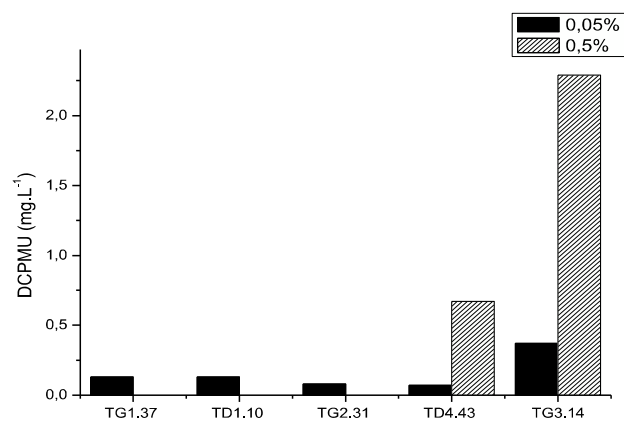
O metabólito DCPU foi produzido por todas as bactérias, exceto a TD1.10, e o metabólito DCA somente foi produzido pelas bactérias TD1.10 e TD3.14. O fato de haver a presença apenas do metabólito DCA no meio de cultivo da bactéria TD1.10 pode indicar que a mesma possa ter produzido o metabólito DCPU, que foi rapidamente degradado a DCA.

As outras oito bactérias referentes a Figura 14, não apresentaram metabólitos detectáveis nos meios de cultivo.

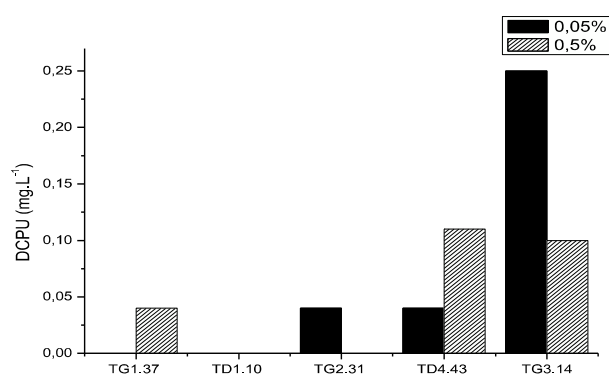
A Tabela 4 resume a degradação do diuron e produção de metabólito pelas 13 bactérias estudadas.

Figura 15: Teores de DCPMU (A), DCPU (B) e DCA (C) encontrados nos meios de cultivo das cepas bacterianas após 48 de fermentação em meios com diferentes concentrações de glicose.

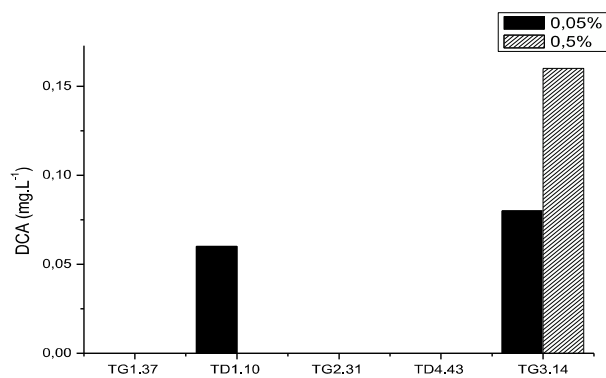
a)



b)



c)



Para a confirmação dos metabólitos encontrados, foi utilizada espectrometria de massas usando como padrão uma mistura de padrões contendo diuron e mais 3 metabólitos (Figura 10). Os metabólitos encontrados nas amostras por injeção em HPLC (DCPMU, DCPU e DCA) foram confirmados no LC/MS/MS, sendo os resultados exemplificados nas figuras 15 a 16.

Figura 16: Cromatograma referente aos padrões injetados em LC/MS/MS.

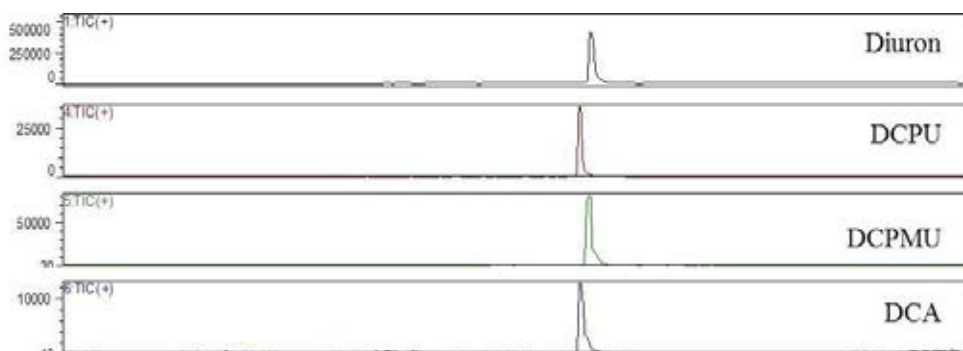


Figura 17: Cromatograma para detecção da presença de diuron e seus metabólitos na amostra do meio de cultivo do isolado TG2.31.

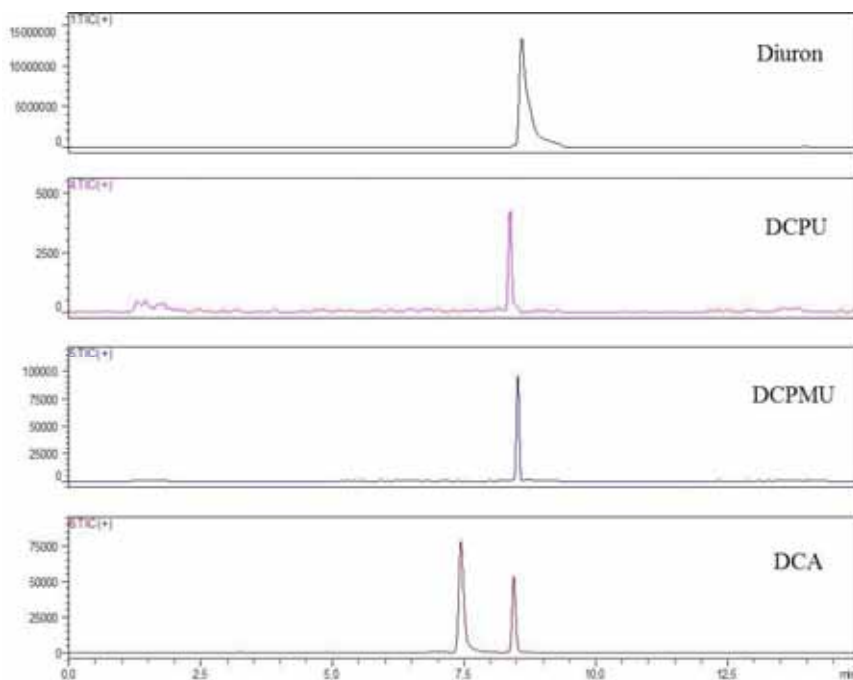


Figura 18: Confirmação da presença de diuron e seus metabólitos na amostra do isolado TD1.10.

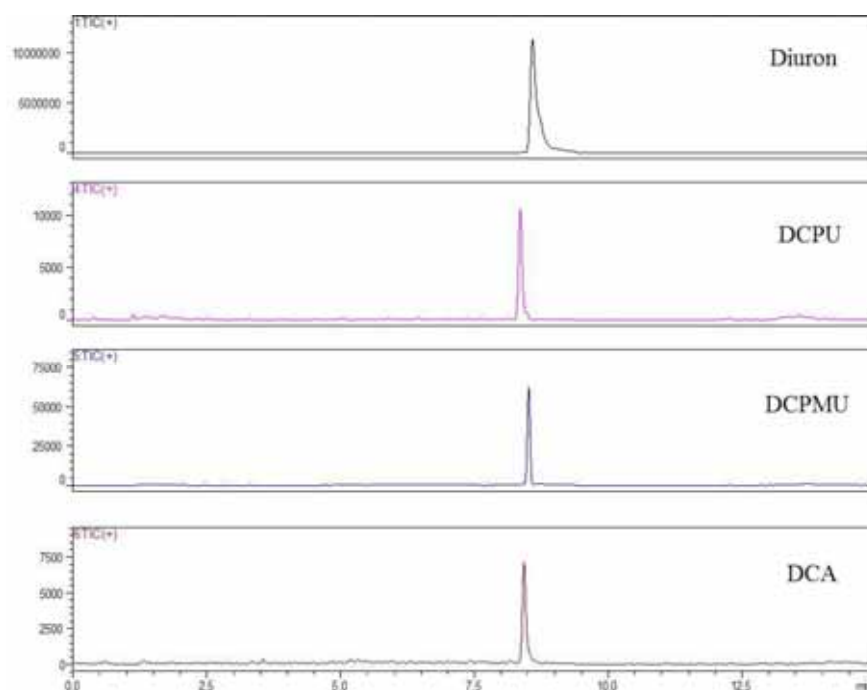


Tabela 5: Síntese da degradação de diuron e produção de metabólitos pelas cepas bacterianas.

Linhagem	Consumo de Diuron (%)	Metabólitos mg/L		
		DCA	DCPU	DCPMU
TG 1.41	0	-	-	-
<i>Lysinibacillus</i> sp TG1.37	29	-	-	0,13
TD 1.10	32	0,06	-	0,13
<i>Klebsiella oxytoca</i> TD1.46	0	-	-	-
TG 2.31	41	-	0,04	0,19
TG 2.38	5	-	0,1	-
TD 2.18	0	-	-	-
<i>Leucobacter</i> sp TG3.14	30	0,08	0,25	0,37
<i>Delftia</i> sp TD3.31	0	-	-	-
TG 4.48	0	0,96	-	-
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> TD4.7	0	0,13	-	-
TD 4.31	0	0,10	-	-
<i>Pseudomonas</i> TD4.43	36	-	0,04	0,07

5.1.4 Influência do meio e condições de cultivo sobre a eficiência de degradação do herbicida diuron pelas bactérias

O experimento foi realizado segundo a metodologia de Placket & Burman, com 8 experimentos, 4 variáveis independentes e 3 variáveis inertes. As Tabelas 5 e 1A (apêndice) apresentam os experimentos realizados e os resultados de porcentagem de degradação de diuron por cada bactéria estudada.

Foi determinado o nível de significância ($p = 0,1$) e o limite de confiança (90%) para o experimento, esperando encontrar níveis de R^2 igual ou superiores a 0,8. Entretanto, foram obtidos valores de R^2 entre 0,3 a 0,7, o que indica que o experimento não se enquadrou no intervalo de confiabilidade do teste estatístico. Mesmo dentro dessa limitação dos dados pode-se observar a variável que parece ter influenciado mais fortemente a degradação do diuron foi a glicose ($p = 0,10$).

Analisando separadamente cada bactéria, observa-se que:

- TG1.41: A média dos pontos centrais é mais ou menos 11. Resultados maiores que esse seria os experimentos 3 e 5. A tabela 6 mostra que ambos usam glicose e vitaminas na maior concentração testada, sugerindo que quantidades maiores desses compostos aparentam ser importantes para a eficiência de degradação do herbicida por essa bactéria. A interação de um pH mais baixo e uma concentração de nitrogênio maior com as outras duas variáveis também pode ser importante, visto que essa condição foi a que produziu melhor resultado.
- TG2.31: A glicose teve efeito positivo indicando que maiores concentrações levariam a maior degradação, contrariando o observado em ensaios individuais. Destaque-se que os valores máximos não atingiram 0,5% que foi o valor usado nos ensaios preliminares, enquanto o nitrogênio exerceu efeito negativo, ou seja, menores quantidades de nitrogênio levando a menores degradações.
- TG2.38: Em relação à glicose a análise é semelhante à anterior. Os efeitos das outras variáveis não são praticamente nada significativos.
- TG3.14: Nenhuma das variáveis mostraram efeito significativo, mas a glicose também tenderia a efeito significativo.
- TG4.48: Nenhuma das variáveis mostraram efeito significativo
- TD2.18: Nenhuma das variáveis mostraram efeito significativo, mas a glicose também tenderia a efeito significativo.

- TD3.31: Esse foi o resultado que obteve o melhor valor de R^2 ($=0,78$), e mostrou efeito na maioria das variáveis. Diferente das demais, para essa bactéria, a glicose não teve efeito significativo.
- TD4.7 e TD4.31: Esses dois últimos estão muito semelhantes. Aqui, nenhuma das variáveis mostrou efeito significativo, mas aqui a glicose não seria a variável mais importante, mas sim a vitamina (positivamente) seguido de nitrogênio (negativamente).

Dentre todas as variáveis testadas, a glicose apresenta ser o nutriente mais importante para a maioria das bactérias. Devem ser realizadas repetições de pelo menos dos pontos centrais, para melhorar o desvio padrão e ter um melhor R^2 para a obtenção de resultados estatisticamente aceitos.

Assim, pode-se concluir que para as bactérias que não tiveram nenhuma variável aceita, a variação do meio de cultivo, nas condições testadas, não influencia na capacidade de degradação do herbicida. Já para as bactérias que tiveram somente a glicose com efeito, o delineamento experimental do tipo Placket & Burman revelou apenas a variável glicose como tendo efeito significativo, dessa forma a variação dessa variável será estudada de forma unipontual. Para as bactérias que tiveram 2 ou mais variáveis significativas, o delineamento experimental do tipo Placket & Burman revelou 3 variáveis significativas para as 9 bactéria. Dessa forma, essas variáveis serão mais bem estudadas através de um planejamento fatorial completo ou um delineamento composto central rotacional (DCCR).

Tabela 6: Planejamento Experimental Modelo Plackett-Burman: Variáveis estudadas e resultadas em % de degradação de diuron.

Exp.	Glicose	pH	Mix de Vitaminas	N	VI-I	VI-II	VI-III	TG1.41	TG2.31	TG2.38	TG3.14	TG4.48	TD2.18	TD3.31	TD4.7	TD4.31
1	1 (0,2%)	-1 (6,5)	-1 (0,0%)	1 (0,9%)	-1	1	1	1,75	9,15	4,17	5,71	1,15	4,51	3,46	1,79	2,42
2	1 (0,2%)	1 (7,5)	-1 (0,0%)	-1 (0,3%)	1	-1	1	5,73	7,37	4,71	9,62	7,91	8,43	3,68	6,28	4,16
3	1 (0,2%)	1 (7,5)	1 (0,1%)	-1 (0,3%)	-1	1	-1	13,18	6,09	5,49	0,38	0,38	7,91	8,04	3,81	3,51
4	-1 (0,0%)	1 (7,5)	1 (0,1%)	1 (0,9%)	-1	-1	1	1,12	-1,59	2,20	2,87	8,74	2,52	-0,35	2,95	3,27
5	1 (0,2%)	-1 (6,5)	1 (0,1%)	1 (0,9%)	1	-1	-1	16,26	3,04	5,10	8,24	3,88	9,85	7,68	6,65	4,14
6	-1 (0,0%)	1 (7,5)	-1 (0,0%)	1 (0,9%)	1	1	-1	-0,55	0,02	1,38	-1,59	5,60	1,47	-0,58	2,91	3,03
7	-1 (0,0%)	-1 (6,5)	1 (0,1%)	-1 (0,3%)	1	1	1	1,89	6,45	3,27	0,12	2,88	8,00	15,43	9,05	15,02
8	-1 (0,0%)	-1 (6,5)	-1 (0,0%)	-1 (0,3%)	-1	-1	-1	4,74	2,90	1,73	6,90	4,07	3,39	6,91	2,57	1,99
9	0 (0,1%)	0 (7,0)	0 (0,2%)	0 (0,6%)	0	0	0	15,46	1,14	5,15	0,98	2,62	1,46	3,02	2,30	1,50
10	0 (0,1%)	0 (7,0)	0 (0,2%)	0 (0,6%)	0	0	0	7,93	2,02	2,72	2,60	4,08	11,69	1,49	5,31	3,90
11	0 (0,1%)	0 (7,0)	0 (0,2%)	0 (0,6%)	0	0	0	11,18	5,58	6,21	2,25	7,26	2,46	1,12	3,98	4,63

5.1.5 Análise dos metabólitos gerados utilizando o planejamento de Plackett-Burman

O planejamento mostrou que as bactérias foram capazes de produzir os metabólitos (Tabela 7), entretanto em menor concentração que os valores encontrados nas fermentações anteriores. Devido ao fato de que os meios de cultivo utilizados foram diferentes e os metabólitos também podem se tornar fonte de carbono no meio nutriente, sua presença dependerá do tempo de cultivo e extração da amostra.

Utilizando a bactéria TG3.14 como exemplo, tem-se que a mesma atingiu a produção de DCPMU, DCPU e DCA nas concentrações de 2,5, 0,25 e 0,15 mg.L⁻¹, em 48 horas, respectivamente. Entretanto, no cultivo de 120 horas as concentrações obtidas foram 1,26, 1,17 e 0,013 15 mg.L⁻¹, respectivamente.

Tabela 7: Concentração dos metabólitos a) DCPMU, b) DCPU e c) DCA, em mg.L⁻¹, originado após 120h de experimento.

a) DCPMU

	TG1.41	TG2.31	TG2.38	TG3.14	TG4.48	TD2.18	TD3.31	TD4.7	TD4.31
1	0.1690			0.0611	0.0226				
2	0.1589			0.3142		-0.0018			
3	0.8523			1,26				0.0025	
4	-0.0014			0.0059				0.0163	-0.0022
5	0.7786				0.0000				
6			-0.0041	0.0046	0.0379				
7	0.0195		0.0165			0.0263	-0.0156		
8	0.0303		0.0189						
9	0.3360		-0.0154	0.0190				0.0054	
10	0.3849		-0.0162	0.1023					0.0144
11	0.3941				-0.0023		-0.0161		-0.0035

b) DCPU

	TG1.41	TG2.31	TG2.38	TG3.14	TG4.48	TD2.18	TD3.31	TD4.7	TD4.31
1	0.0770	0.0827	0.0773						0.0770
2	0.0779		0.0774	1,17			0.0712		0.0779
3	0.0808		0.0772	1,18	0.0713				0.0808
4	0.0951	0.0791	0.0995	0.0754	0.0748	0.0791	0.0783	0.0781	0.0951
5	0.0780	0.0764	0.0713		0.0714		0.0644		0.0780
6	0.0996	0.0775	0.0988	0.0774	0.0776	0.0820	0.0796	0.0806	0.0996
7									
8			0.0682	0.1957					
9	0.0842		0.0821	0.2967	0.0706		0.0668		0.0842
10	0.0874		0.0849	0.0837	0.0712		0.0744		0.0874
11	0.0837		0.0856	0.2216	0.0712				0.0837

c) DCA

	TG1.41	TG2.31	TG2.38	TG3.14	TG4.48	TD2.18	TD3.31	TD4.7	TD4.31
1		0.0279	0.0428			0.0307	0.0226	0.0313	0.1529
2		0.0144	0.0447		0.0194	0.0243	0.0290	0.0263	0.0200
3		0.0276	0.0543		0.0244	0.0316	0.0135	0.0183	0.0498
4		0.0166	0.0486		0.0219		0.0159	0.0228	0.0234
5		0.0394	0.0682		0.0271	0.0140	0.0266	0.0291	0.0541
6		0.0288	0.1049		0.0235		0.0295	0.0273	0.0168
7		0.0344	0.0757			0.0292	0.0216	0.0236	0.0475
8	0.0196	0.0280	0.0163			0.0254	0.0231	0.0350	0.0721
9		0.0143	0.0590			0.0387	0.0231	0.0457	0.0183
10	0.0067	0.0168	0.0517	0.0137		0.0263	0.0201	0.0181	0.0147
11		0.0356	0.0226	0.0282	0.0410	0.0197	0.0126	0.0289	0.0342

5.2 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON POR CONSÓRCIO MICROBIANO

Entre as bactérias estudadas, foram selecionadas 5 cepas com maior capacidade de degradação do diuron as quais foram cultivadas juntamente com o fungo *Mortirella alpina*. Esse fungo demonstrou boa tolerância e capacidade de degradação do diuron em experimento anterior (EGEA, 2014).

Os dados da tabela 8 (médias de triplicatas) mostram que houve um baixo consumo de diuron por todos os consórcios ensaios com a utilização de consórcio microbiano, assim como, não foram detectados metabólitos nos meios de cultivo, com exceção do meio onde foi cultivada a cepa *Leucobacter* sp TG 3.14. A associação do fungo com esta última cepa resultou em degradação de 30% do diuron adicionado ao meio e a geração de DCPU 3,13 mg/L⁻¹ e DCPMU 2,89 mg/L⁻¹. Esse nível de degradação foi muito similar ao obtido com o uso da bactéria em cultura exênica indicando que o fungo não influenciou na degradação embora tenham ocorrido diferenças entre as concentrações dos metabólitos. Na cultura com apenas as bactérias não se obteve concentrações detectáveis dos metabólitos.

Tabela 8: Degradação de diuron e produção de metabólitos por consórcios microbianos com bactéria e o fungo *Mortirella alpina*.

Cepas	Consumo do Diuron (%)	Metabólitos mg/L		
		DCA	DCPU	DCPMU
<i>Lysinibacillus</i> sp TG1.37 + <i>M. alpina</i>	5	-	-	-
TD 1.10 + <i>M. alpina</i>	8	-	-	-
TG 2.31	8	-	-	-
<i>Leucobacter</i> sp TG3.14 + <i>M. alpina</i>	30	0,17	3,13	2,89
<i>Pseudomonas</i> TD4.43 + <i>M. alpina</i>	9	-	-	-

5.3 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON POR ENSAIOS DE MICROCOSMOS

Os ensaios de microcosmos foram realizados utilizando as cinco cepas bacterianas em culturas puras. Os dados da Tabela 9 mostram aumentos nos níveis de degradação para até 56% e não houve a identificação de subprodutos ao final da fermentação, possivelmente tenha sido degradado durante o processo. Esses resultados mostram que o tipo de meio de cultivo influencia na habilidade das cepas em degradar o diuron

Tabela 9: Degradação do diuron e geração de subprodutos em ensaios de microcosmos.

Foram utilizadas em culturas bacterianas puras, 10 mg de diuron /g de solo com 30% de umidade e 120 horas dias de cultivo.

Cepas	Consumo de Diuron (%)	Metabólitos		
		DCA	DCPU	DCPMU
<i>Lysinibacillus</i> sp TG1.37	22	-	-	-
TD 1.10	56	-	-	-
TG 2.31	34	-	-	-
<i>Leucobacter</i> sp TG3.14	36	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> TD4.43	8	-	-	-
TG2.38	38			

5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO DIURON E SEUS METABÓLITOS EM PEIXES

A toxicidade do diuron residual e dos metabólitos gerados sobre *A. altiparanae* foi avaliada utilizando-se o meio de cultura da bacteriana *Leucobacter* sp TG3.14. A cepa foi cultivada em meio líquido contendo 10 ppm de diuron por 72 h

conforme descrito no item 5.4. O material foi centrifugado, filtrado em filtro 0,22 μ e analisado em espectrofotômetro UV/VIS para quantificação do diuron residual e seus metabólitos (Tabela 10).

O meio de cultura, sem a biomassa, foi utilizado para contaminar água de aquários de manutenção dos peixes, tomando por referência concentrações de diuron residual (de 0,015 a 0,15 mg/L) com base em resultados prévios utilizando o diuron em sua forma pura (SANCHES, 2014).

As referências de toxicidade foram a atividade da enzima 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e lesões no DNA avaliada pela técnica do cometa.

Tabela 10: Características do meio obtido após o cultivo *Leucobacter* sp TG3.14.

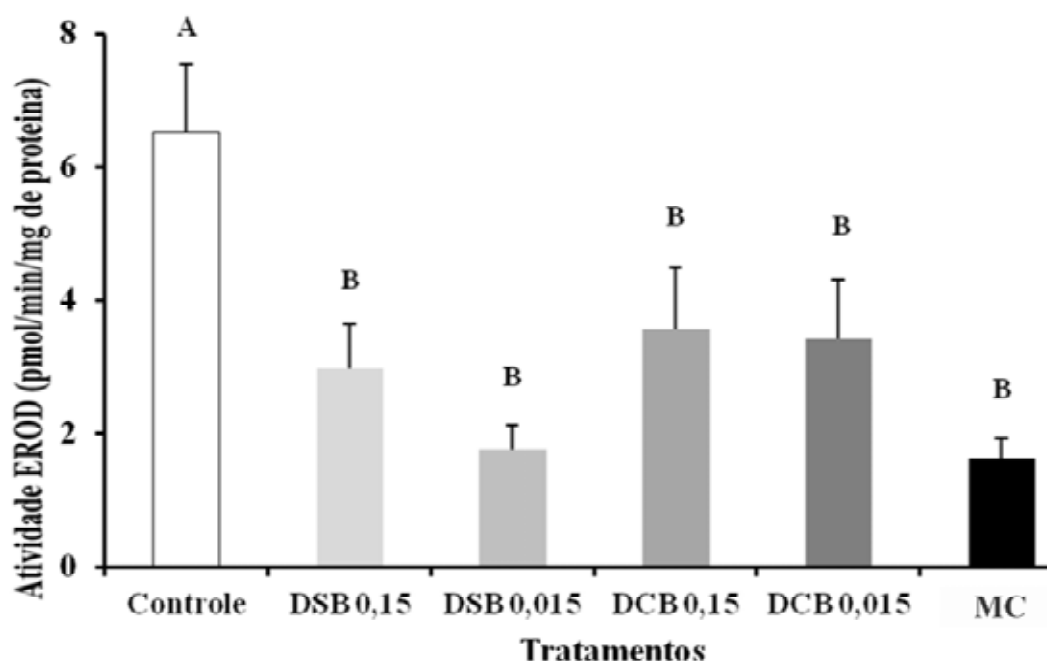
Compostos	Concentração dos compostos no meios de cultivo (mg/L)	Concentrações de composto usado nos tanques (μ g/L)
Diuron	10,7	15 e 150
DCPU	2,46	3 e 30
DCPMU	0,22	0,3 e 3
DCA	0,19	0,2 e 2

5.4.1 A atividade enzimática da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade da EROD em fígado de lambaris diminuiu significativamente nos animais expostos ao diuron e seus metabólitos em comparação aos animais do tratamento controle (Figura 19). Essa diminuição na atividade da EROD possivelmente está relacionada a uma inibição das isoenzimas do citocromo P450. Segundo Whyte *et al.* (2000, um aumento na atividade da EROD em peixes, foi detectada em resposta a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Ainda, segundo os mesmos autores, EROD de fígados de ratos, expostos *in vitro* e *in vivo*, ao diuron, teve redução na sua atividade, do mesmo modo que o observado em nosso estudo.

Chama a atenção, no entanto, o efeito do meio de cultura, sem adição de diuron e sem o crescimento bacteriano, sobre a atividade da EROD. Esses resultados podem estar relacionados ao estresse exercido sobre os peixes pela adição de matéria orgânica e componente de cor à água dos aquários. Esse efeito, por ter sido bastante significativo será melhor explorado em ensaios futuros.

Figura 19: Atividade enzimática da 7-etoxiresorufina-Odeetilase (EROD). Controle= peixes em aquários sem contaminantes; DSB=Adição de meio com diuron sem crescimento bacteriano (controle abiótico); DCB= adição de meio de cultura com diuron após crescimento bacteriano.



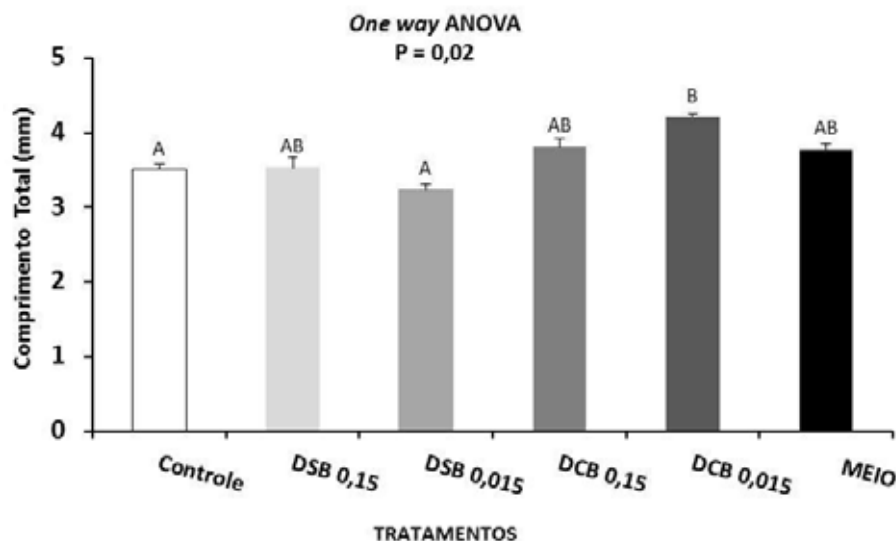
5.4.2 Ensaio do cometa

A análise do DNA dos nucleóides de hemácias dos peixes tratados e não tratados com diuron e derivados, pela técnica do cometa, revelaram que houve diferença significativa apenas nos scores do tratamento DCB 0,015, em comparação com o controle e com os outros tratamentos (Figura 20).

Esse resultado pode ser explicado por possível reversão das alterações no DNA, pelo sistema de reparo do organismo. Sabe-se que em concentrações muito baixas do agente genotóxico, esse sistema de reparo não é ativado e a manutenção da exposição a esse agente, leva a alterações detectáveis no DNA. Por outro lado, concentrações mais elevadas, que gerem mudanças mais drásticas no DNA, ativam mais eficientemente o reparo.

Esses resultados confirmam aqueles obtidos por Sanches (2014) que o diuron e seus metabólitos exercem efeito tóxico e genotóxico sobre peixes e revelam que a ação da microbiota dos solos e sedimentos, sobre esse herbicida, pode ser um fator de impacto ambiental merecendo mais investigações.

Figura 20: Scores obtidos com o ensaio de cometa em eritrócitos de lambaris. Controle= peixes em aquários sem contaminantes; DSB=Adição de meio com diuron sem crescimento bacteriano (controle abiótico); DCB= adição de meio de cultura com diuron após crescimento bacteriano; MC= adição do meio de cultura sem diuron e sem crescimento bacteriano.



6 CONCLUSÕES

A metodologia padronizada para os ensaios utilizando a *K. oxytoca* TD1.46 foi adequada para todas as outras cinco cepas testadas, permitindo um intervalo de variação particular para cada uma das bactérias usada.

As bactérias mostraram tolerância e/ou degradação do diuron, porém, em diferentes níveis permitindo concluir que essas características são variáveis na microbiota do solo.

A glicose interferiu fortemente na degradação do diuron de forma positiva ou negativa dependendo da concentração. A utilização do consórcio microbiano nas metodologias aplicadas não obteve grande aumento em degradação, destacando-se apenas a cepa *Leucobacter* sp TG 3.14, que obteve 30% de degradação e a geração de dois metabólitos.

Houve aumento nos níveis de degradação do diuron pelas bactérias quando cultivadas em solo durante os testes de microcosmos, mostrando ser mais facilmente disponível para degradação.

Os ensaios de toxicidade mostraram uma inibição da atividade da enzima 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e alteração no DNA sugerindo efeitos tóxicos e genotóxico do diuron e seus derivados, presentes no meio de cultivo das bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, F. N.; “*Avaliação da degradação de tinta imobiliária e seus componentes por fungos mesofílicos*” 2014 Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.
- BATISSON, I.; PESCE, S.; BESSE-HOGGAN, P.; SANCELME, M; BOHATIER, J. Isolation and Characterization of Diuron-degrading Bacteria from Lotic Surface Water. *Microbial Ecology*. v.54, p.761-770, 2007.
- BLANCO, F. M. G.. Controle das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. *Anais Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico*. p.83-89, 2003.
- BRUSSLAN, J.; HASELKORN, R. Resistance to the photosystem II herbicide diuron is dominant to sensitivity in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *The EMBO Journal*, v.8, p.1237-1245, 1989.
- BOZCAARMUTLU, A; ARINC, E. “Inhibitory effects of divalent metal ions on liver microsomal 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity of leaping mullet”. *Marine Environmental Research*, v.58, p. 521-524, 2004.
- Di GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. *The Toxicology of fish*. Taylor & Francis Group, 2008.cap 4.
- DOMINGUES, A.; BARBISAN F.L.; MARTINS R.P.; SPINARDI-BARBISAN, T.L.A.; Diuron exposure induces systemic and organ-especific toxicity following acute and sub-chronic exposure in male wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. V.31, p. 387-396, 2011.
- EGEA, T. C.; “*Estudo do potencial de degradação do herbicida diuron e seus metabólitos por bactérias isoladas de solo de canavial*” Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.
- EMBRAPA. Cana-de-açúcar: Impactos ecológicos. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-açúcar/arvore/CONT1.html>> Acesso em: 10/01/2014
- ESPOSITO, E.; PAULILLO, S. M.; MANFIO, G. P.; Biodegradation of the herbicide Diuron in soil by indigenous Actinomycetes., v. 37 (3), p.541-548, 1998
- EPA. Environmental Protection Agency. Disponível em: http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/disk2_index.cfm> Acesso em 20/03/2012.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003

- FIELD, J.A.; REED, R. L.; SAWYER, T. E.; MARTINEZ, M. Diuron and Its Metabolites in Surface Water and Ground Water by Solid Phase Extraction and In-Vial Elution. *J. Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.3897-3902, 1997.
- FILIZOLA, H.F.; FERRACINI V.L.; SANS, L.M.A.; GOMES, M.A.F.; FERREIRA, C.J.A. (2002). "Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra". *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.37, n.5, p.659-667.
- FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v.23,nº 4, p.504-511, 2000.
- GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere*, v.56, p.1021-1032, 2004.
- GIANFREDA, L.; MORA, M. L.; DIEZ, M. C. Restoration of polluted soils by means of microbial and enzymatic processes. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, v.6, p. 20-40, 2006.
- GODA, S. K.; ELSAYED, I. E.; KHODAIR, T. A.; EL-SAYED, W.; MOHAMED, M. E. Screening for and isolation and identification of malathion-degrading bacteria: cloning and sequencing a gene that potentially encodes the malathion-degrading enzyme, carboxylestrase in soil bacteria. *Biodegradation*. v.21, p.903-913, 2010.
- GOLOVLELA, L.A.; ALIYEVA, R.M.; NAUMOVA, R.P; GVOZDYAK, P.I. Microbial bioconversion of pollutants. Review of environmental contamination and toxixology, v.124, p.41-78, 1992.
- HODGSON, E. Em *A Textbook of Modern Toxicology.*, 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. cap. 1.
- KAMMAN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 498, p. 61-77, 2001.
- KUMAR A, DOAN H, BARNES M, CHAPMAN JC, KOOKANA RS. Response and recovery of acetylcholinesterase activity in freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae) exposed to selected anti-cholinesterase insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2010; 73: 1503–10.
- LENNARTZ, B., LOUCHART, X., VOLTZ, M., ANDRIEUX, P. (1997). "Diuron and simazine losses to runoff water in Mediterranean vineyards". *Journal of Environmental Quality*, v.26, n.6, p.1493-1502.
- LISBOA, R.; SENA, J.; DUTRA, T. Uso de agrotóxicos na produção de hortaliças da bacia hidrográfica do Natuba, afluente do Tapacurá, PE, e conseqüências sobre o meio ambeinte e saúde dos agricultores. CEFET, 2007

- MACIEL, C.D.G. et al. Eficiência e seletividade dos herbicidas trifloxysulfuron-sodium + ametryne e hexazinone + diuron em função da tecnologia de aplicação e do manejo mecânico da palha de cana-de-açúcar na linha de plantio. *Planta daninha* [online]. 2008, vol.26, n.3, pp. 665-676. ISSN 0100-8358.
- MAGNUSSUM, M.; HEIMANN, K.; RIDD M.; NEGRI, M. Pesticide contamination and phytotoxicity of sediment interstitial water to tropical benthic microalgae. *Water Research* 47, 5211 e 5221, 2013
- MASCHIO, L. R. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto – SP. 2008. 194f. Dissertação de Pós Graduação para a obtenção do título de doutor em Genética – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Agronegócio Brasileiro: Uma oportunidade de Investimentos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatistica/anuario_cana.pdf> Acesso em: 30/09/2014.
- MORENO, C. M.; BECERRA, A. G.; SANTOS, M. J. B. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.21, p.103-120, 2004.
- NESTLER, H.; GROGH, J.K.; SCHONENBERGER, R.; EGGEN I.L.R.; SUTER F.J. M.; Liking proteome responses with physiological and biochemical effects in herbicide exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. V.75, issue 17, p. 5370-5385, 2012.
- NOGUEIRA, L. Estudo comparativo do estresse oxidativo entre tilápias (*Oreochromis niloticus*) e cascudos (*Pterygoplichthys anisitsi*) expostos a óleo diesel. 2008. 52f. Trabalho de conclusão de curso para o grau de Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto
- NOJIRI, H.; TSUDA, M. Functional evolution of bacteria in degradation of environmental pollutants. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, v.50, nº12, p.1505-1509, 2005.
- OKAMURA, H.; AOYAMA, I; ONO NASHIDA, T. Antifouling herbicides in the coastal Waters of western Japan. *Mar. Pollut. Bull*, v. 47, p.59-97, 2003.
- PETROBRÁS. Energia e Tecnologia. Biocombustível. Disponível em:<http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/fontes-de-energia-biocombustiveis/>> Acesso em 04/10/2014

- RAGO, J. P.; COLSON, A. M. Molecular basis for resistance for Antimycin and Diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, v.239, p.12564-12570, 1988.
- ROCHA, B.T.J.; SARAIVA, A. R.; GARCIA, C. S.; GRAVINA, S. F.; NOGUEIRA, W.C.; Aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations Toxicology Research V.1, p. 77-152 , 2012.
- ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. Scientia Agrícola, v.57, n. 4, p. 723-728, 2000.
- RONCO, A. et al. Em Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones; Morales, G. C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, cap. 1, 2004
- SAMPAIO, J. et al.; Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. v. 10, n. 4, p. 462-467, out./dez. 2012
- SANCHES, ALM. *Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (Astyanax sp.): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação*”, 2014 Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.
- ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. Scientia Agrícola, v.57, p.723-728, 2000.
- SINGH, M. et al. Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E. Experimental and Toxicologic Pathology, v. 63, p. 269–276, 2011.
- SORENSEN, S. R.; ALBERS, C. N. AAMAND, J. Rapid Mineralization of the phenylurea Herbicide Diuron by Variovorax sp. Starin SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium, Applied and Environmental Microbiology, Apr.; p. 2332-2340, 2008.
- SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. 4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás-PDPETRO, Campinas, p. 1-10, 2007.
- TIXIER, C., BOGAERTS, P., SANCELME, M., BONNEMOY, F., TWAGILIMANA, L., CUER, A., BOHATIER, J. VESCHAMBREL, H. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites. **Pest Management Science** v.56, p.455-462, 2000.

- TOMAZ R.M.A.G. Avaliação de fungos com potencial de degradação de Diuron e Pyrethrin-sodium. 134f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia de Química, Campinas, 2003.
- TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. “Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão”. *Oecologia Australis*, v.14(4), p.1025-1035, 2010.
- VAN BEILEN, J.B.; FUNHOFF, E.G. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v.16, p.308-314, 2005.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, v. 13, n.2, p. 57–149, 2003.
- VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. O setor de agroquímica, BNDS Setorial, v.24, p.69-96, 2006.
- ZHU, B.; LIU, T.; HU, X.; WANG, G.(2012) Developmental toxicity of 3,4-dichloroaniline on rare minnow (*Gobionema rarus*) embryos and larvae., *Chemosphere*, v. 90(3), pg 1132-9
- WHYTE, J. J. *et al.* Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol*, v. 30, n. 4, p. 347–570, 2000.

APÊNDICE

Tabela 11: Planejamento Plackett-Burman, analisado em programa Statistic versão 7.0, para cada bactéria.

TG1.41

Effect Estimates; Var.:TG1.41; R-sqr=,47543; Adj.:12571 (PB 08) 4 Factor Screening Design; MS Residual=31,97413 DV: TG1.41										
Factor	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	7,15352	1,704916	4,195822	0,005712	3,84056	10,46648	7,153524	1,704916	3,84056	10,46648
(1)Glicose (%)	7,43401	3,998383	1,859253	0,112340	-0,33557	15,20358	3,717003	1,999191	-0,16779	7,60179
(2)pH	-1,29033	3,998383	-0,322712	0,757862	-9,05991	6,47925	-0,645164	1,999191	-4,52995	3,23963
(3)Vitamina (%)	5,19465	3,998383	1,299188	0,241566	-2,57493	12,96423	2,597325	1,999191	-1,28746	6,48211
(4)Nitrogenio (%)	-1,73846	3,998383	-0,434792	0,678916	-9,50804	6,03112	-0,869232	1,999191	-4,75402	3,01556

TG2.31

Effect Estimates; Var.:TG2.31; R-sqr=,66052; Adj.:4342 (PB 08) 4 Factor Screening Design; MS Residual=6,325113 DV: TG2.31										
Factor	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	3,83282	0,758294	5,05453	0,002323	2,35932	5,306325	3,83282	0,758294	2,35932	5,306325
(1)Glicose (%)	4,46710	1,778358	2,51192	0,045784	1,01143	7,922765	2,23355	0,889179	0,50571	3,961383
(2)pH	-2,41124	1,778358	-1,35588	0,223943	-5,86691	1,044426	-1,20562	0,889179	-2,93346	0,522213
(3)Vitamina (%)	-1,36071	1,778358	-0,76515	0,473196	-4,81638	2,094964	-0,68035	0,889179	-2,40819	1,047482
(4)Nitrogenio (%)	-3,04942	1,778358	-1,71474	0,137218	-6,50509	0,406249	-1,52471	0,889179	-3,25255	0,203125

TG2.38

Effect Estimates; Var.:TG2.38; R-sqr=,64529; Adj.:40882 (PB 08) 4 Factor Screening Design; MS Residual=1,615791 DV: TG2.38										
Factor	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	3,829801	0,383262	9,992633	0,000058	3,08505	4,574549	3,829801	0,383262	3,08505	4,574549
(1)Glicose (%)	2,724102	0,898830	3,030719	0,023077	0,97751	4,470690	1,362051	0,449415	0,48876	2,235345
(2)pH	-0,124180	0,898830	-0,138157	0,894636	-1,87077	1,622409	-0,062090	0,449415	-0,93538	0,811205
(3)Vitamina (%)	1,017279	0,898830	1,131781	0,300923	-0,72931	2,763868	0,508639	0,449415	-0,36466	1,381934
(4)Nitrogenio (%)	-0,589493	0,898830	-0,655845	0,536247	-2,33608	1,157096	-0,294747	0,449415	-1,16804	0,578548

TG3.14

Factor	Effect Estimates; Var.:TG3.14; R-sqr=,39951; Adj:0, (PB 08) 4 Factor Screening Design; MS Residual=13,26254 DV: TG3.14									
	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	3,46301	1,098037	3,153817	0,019719	1,32932	5,596693	3,46301	1,098037	1,32932	5,596693
(1)Glucose (%)	3,91226	2,575126	1,519251	0,179505	-1,09167	8,916196	1,95613	1,287563	-0,54584	4,458098
(2)pH	-2,42238	2,575126	-0,940683	0,383179	-7,42631	2,581556	-1,21119	1,287563	-3,71316	1,290778
(3)Vitamina (%)	-2,25750	2,575126	-0,876655	0,414391	-7,26143	2,746436	-1,12875	1,287563	-3,63072	1,373218
(4)Nitrogenio (%)	-0,44806	2,575126	-0,173995	0,867592	-5,45199	4,555875	-0,22403	1,287563	-2,72600	2,277938

TG4.48

Factor	Effect Estimates; Var.:TG4.48; R-sqr=,34413; Adj:0, (PB 08) 4 Factor Screening Design; MS Residual=8,028576 DV: TG4.48									
	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	4,41591	0,854325	5,168888	0,002077	2,75580	6,076015	4,415908	0,854325	2,75580	6,076015
(1)Glucose (%)	-1,99348	2,003569	-0,994967	0,358170	-5,88678	1,899811	-0,996742	1,001784	-2,94339	0,949905
(2)pH	2,66223	2,003569	1,328742	0,232230	-1,23107	6,555521	1,331113	1,001784	-0,61553	3,277761
(3)Vitamina (%)	-0,71069	2,003569	-0,354713	0,734940	-4,60399	3,182604	-0,355346	1,001784	-2,30199	1,591302
(4)Nitrogenio (%)	1,03497	2,003569	0,516562	0,623941	-2,85833	4,928263	0,517484	1,001784	-1,42916	2,464132

TD2.18

Factor	Effect Estimates; Var.:TD2.18; R-sqr=,4315; Adj:,0525 (PB 08) 4 Factor Screening Design; MS Residual=12,68134 DV: TD2.18									
	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	5,60732	1,073708	5,222385	0,001972	3,52091	7,693725	5,60732	1,073708	3,52091	7,693725
(1)Glucose (%)	3,83210	2,518069	1,521839	0,178872	-1,06097	8,725157	1,91605	1,259034	-0,53048	4,362578
(2)pH	-1,35163	2,518069	-0,536771	0,610735	-6,24469	3,541434	-0,67581	1,259034	-3,12234	1,770717
(3)Vitamina (%)	2,62119	2,518069	1,040952	0,338014	-2,27187	7,514251	1,31059	1,259034	-1,13594	3,757125
(4)Nitrogenio (%)	-2,34376	2,518069	-0,930778	0,387886	-7,23683	2,549298	-1,17188	1,259034	-3,61841	1,274649

TD3.31

Factor	Effect Estimates; Var.:TD3.31; R-sqr=,78149; Adj:,63581 (PB 08) 4 Factor Screening Design; MS Residual=8,074842 DV: TD3.31									
	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	4,53536	0,856783	5,29348	0,001841	2,87048	6,20024	4,53536	0,856783	2,87048	6,20024
(1)Glucose (%)	0,35887	2,009333	0,17860	0,864130	-3,54563	4,26336	0,17943	1,004667	-1,77281	2,13168
(2)pH	-5,67267	2,009333	-2,82316	0,030228	-9,57716	-1,76817	-2,83633	1,004667	-4,78858	-0,88409
(3)Vitamina (%)	4,33285	2,009333	2,15636	0,074449	0,42836	8,23735	2,16643	1,004667	0,21418	4,11868
(4)Nitrogenio (%)	-5,96285	2,009333	-2,96758	0,025036	-9,86735	-2,05836	-2,98143	1,004667	-4,93368	-1,02918

TD4.7

Effect Estimates; Var.:TD4.7; R-sqr=,37789; Adj:0, (PB 08) 4 Factor Screening Design; MS Residual=5,222065 DV: TD4.7										
Factor	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	4,32727	0,689009	6,28043	0,000758	2,98840	5,666139	4,327270	0,689009	2,98840	5,666139
(1)Glucose (%)	0,26083	1,615869	0,16142	0,877061	-2,87909	3,400759	0,130417	0,807934	-1,43955	1,700379
(2)pH	-1,02907	1,615869	-0,63685	0,547733	-4,16900	2,110852	-0,514536	0,807934	-2,08450	1,055426
(3)Vitamina (%)	2,22724	1,615869	1,37835	0,217285	-0,91269	5,367162	1,113619	0,807934	-0,45634	2,683581
(4)Nitrogenio (%)	-1,85163	1,615869	-1,14591	0,295472	-4,99156	1,288290	-0,925817	0,807934	-2,49578	0,644145

TD4.31

Effect Estimates; Var.:TD4.31; R-sqr=,48013; Adj:,13354 (PB 08) 4 Factor Screening Design; MS Residual=11,71756 DV: TD4.31										
Factor	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	4,32442	1,032101	4,18992	0,005750	2,31886	6,329982	4,32442	1,032101	2,31886	6,329982
(1)Glucose (%)	-2,27053	2,420492	-0,93804	0,384429	-6,97398	2,432925	-1,13526	1,210246	-3,48699	1,216462
(2)pH	-2,39812	2,420492	-0,99076	0,360062	-7,10157	2,305334	-1,19906	1,210246	-3,55079	1,152667
(3)Vitamina (%)	3,58409	2,420492	1,48073	0,189179	-1,11936	8,287546	1,79205	1,210246	-0,55968	4,143773
(4)Nitrogenio (%)	-2,95177	2,420492	-1,21949	0,268417	-7,65522	1,751683	-1,47588	1,210246	-3,82761	0,875841