

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO
CAMPUS RIO VERDE**

ALEX MARCELINO DOS SANTOS

Impacto do herbicida glifosato e do metal pesado cádmio sobre a vitalidade e fisiologia dos líquens *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale e *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg.

**Rio Verde - GO
Janeiro 2022**



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CÂMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Rodovia Sul Goiana, km 01, Zona Rural – Rio Verde - GO
CEP: 75.901-970. Fones: (64) 3620-5641. Fax: (64) 3620-5640

Impacto do herbicida glifosato e do metal pesado cádmio sobre a vitalidade e fisiologia dos líquens *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale e *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg.

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação – *Stricto sensu* em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dra. Luciana Vitorino
Mestrando: Alex Marcelino dos Santos

RIO VERDE – GO
Janeiro 2022

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

SSA237 Santos, Alex Marcelino Dos Santos
i Impacto do herbicida glifosato e do metal pesado
cádmio sobre a vitalidade e fisiologia dos líquens
Parmotrema tinctorum (Nyl.) Hale e Usnea barbata
(L.) F.H.Wigg. / Alex Marcelino Dos Santos Santos;
orientadora Luciana Cristina Vitorino; co-
orientador Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho . --
Rio Verde, 2022.
38 p.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e
Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2022.

1. bioindicadores. 2. líquens. 3. agrotóxicos. 4.
glifosato. 5. cádmio. I. Cristina Vitorino, Luciana
, orient. II. Carvalho Vasconcelos Filho, Sebastião
, co-orient. III. Título.

Responsável: Johnathan Perera Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |
| <input type="checkbox"/> Produto técnico e educacional - Tipo: <input type="text"/> | |

Nome completo do autor:

Matrícula:

Título do trabalho:

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

 Documento confidencial: Não Sim, justifique:

 Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano: / /

 O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

 O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

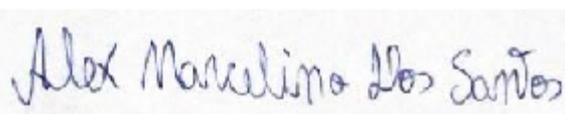
O(s) referido(s) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Local

 / /

Data



Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
 INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 111/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGFI-RV/CMPRV/IFGOIANO

IMPACTO DO HERBICIDA GLIFOSATO E DO METAL PESADO CÁDMIO SOBRE A VITALIDADE E FISIOLOGIA DOS LÍQUENS *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale E *Usnea barbata* (L.) F.H. Wigg.

Autor: Alex Marcelino dos Santos
 Orientadora: Prof.ª Dr.ª Luciana Cristina Vitorino

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação - Área de Concentração Conservação dos Recursos Naturais

APROVADA em 30 de novembro de 2021.

Prof.ª Dr.ª Michellia Pereira
 Soares
 Avaliadora externa - IFNMG
 / Salinas

Prof. Dr. Roniel Geraldo Ávila
 Avaliador externo - IF Goiano / Rio
 Verde

Prof.ª Dr.ª Luciana Cristina Vitorino
 Presidente da Banca - IF Goiano / Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Roniel Geraldo Ávila, Roniel Geraldo Ávila - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde (1005111/000506), em 30/11/2021 14:08:12.
- Michellia Pereira Soares, Michellia Pereira Soares - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Fnmg (11172/05000643), em 30/11/2021 11:58:47.
- Luciana Cristina Vitorino, PROFESSORA BASKO TITULADORA DO IFCGO, em 30/11/2021 11:41:11.

Este documento foi criado pelo SIAPE em 28/11/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse https://sua.ifgoiano.edu.br/autenticar_documento/ e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 385139
 Código de Autenticação: 95e96/d52



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
 Campus Rio Verde
 Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, RUA, RIO VERDE / GO - CEP 75901-970
 (64) 3620-5600

Sumário

2Resumo geral.....	6
Índice de figuras.....	7
CAPÍTULO I	8
Resumo.....	9
Introdução.....	9
Materiais e métodos.....	10
Resultados e discussão.....	13
Conclusão	23
Referências Bibliográficas	23
CAPÍTULO II	27
Resumo.....	27
Introdução.....	28
Materiais e métodos.....	29
Resultados e discussão.....	30
Conclusão	35
Referências Bibliográficas	35

Resumo geral

SANTOS, M, A. Impacto do herbicida glifosato e do metal pesado cádmio sobre a vitalidade e fisiologia dos líquens *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale e *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg. 2021. Documento apresentado ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, como parte das exigências da Pós-Graduação – Mestrado em Biodiversidade e Conservação.

Líquens são muito sensíveis a alterações ambientais e por suas características morfológicas são considerados excelentes bioindicadores de poluição ambiental, contudo, poucos trabalhos têm associado os líquens a biomonitoramento de poluentes agrícolas. Este trabalho se propôs a avaliar alterações fisiológicas causadas por diferentes concentrações do herbicida glifosato e do metal pesado cádmio a duas espécies de líquens comumente encontrados em fragmentos de Cerrado, as espécies *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*. O propósito do projeto é identificar em ambas as espécies os biomarcadores mais sensíveis, de forma a gerar perspectiva para sua utilização no biomonitoramento da dispersão de poluentes agrícolas. Foram avaliados a viabilidade celular, os teores de pigmentos fotossintéticos, a fluorescência da clorofila e o metabolismo antioxidante. No tratamento com glifosato foi observado em *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* baixa degradação de pigmentos, redução no número médio de células algais, alterações significativas nos valores da fluorescência da clorofila e na atividade das enzimas antioxidantes, para as espécies tratadas com glifosato, a viabilidade celular, a fluorescência da clorofila e atividade enzimática antioxidante foram os biomarcadores mais promissores a ação do herbicida. No tratamento com cádmio *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* também demonstraram sensibilidade ao metal em relação a vitalidade das células algais e atividade de enzimas antioxidantes, foi observado baixa degradação dos pigmentos e não houve alterações em nenhum parâmetro avaliado na atividade fotoquímica nas duas espécies, sendo assim, a viabilidade das células algais e atividade das enzimas antioxidantes são os biomarcadores mais sensíveis a ação do cádmio.

Palavras-chave: bioindicadores, líquens, agrotóxicos, glifosato, cádmio.

General Abstract

SANTOS, M, A. Impact of the herbicide glyphosate and the heavy metal cadmium on the vitality and physiology of the lichens *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale and *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg. 2021. Document presented to the Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, as part of the requirements of the Post-Graduation – Master's Degree in Biodiversity and Conservation.

Lichens are very sensitive to environmental changes and due to their morphological characteristics, they are considered excellent bioindicators of environmental pollution. However, few studies have associated lichens with biomonitoring of agricultural pollutants. This work aimed to evaluate physiological changes caused by different concentrations of the herbicide glyphosate and heavy metal cadmium to two lichen species commonly found in Cerrado fragments, *Parmotrema tinctorum* and *Usnea barbata*. The purpose of the project is to identify the most sensitive biomarkers in both species, to generate perspective for their use in the biomonitoring of the agricultural pollutant dispersion. Cell viability, photosynthetic pigment levels, chlorophyll fluorescence and antioxidant metabolism were evaluated. In the treatment with glyphosate, it was observed in *Parmotrema tinctorum* and *Usnea barbata* low degradation of pigments, reduction in the average number of algal cells, significant changes in the values of chlorophyll fluorescence and in the activity of antioxidant enzymes, for the species treated with glyphosate, cell viability, chlorophyll fluorescence and antioxidant enzyme activity were the most promising biomarkers of herbicide action. In the treatment with cadmium *Parmotrema tinctorum* and *Usnea barbata* also showed sensitivity to the metal in relation to the vitality of algal cells and activity of antioxidant enzymes, low degradation of the pigments was observed and there were no changes in any parameter evaluated in the photochemical activity in the two species, thus, the viability of algal cells and the activity of antioxidant enzymes are the most sensitive biomarkers to the cadmium action.

Keywords: bioindicators, lichens, pesticides, glyphosate, cadmium.

Índice de figuras

Capítulo I

Figura 1 – Líquens *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale (A) e *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg (B) coletados em área de preservação permanente, do tipo Cerrado *sensu stricto*.

Figura 2 – Número médio de células viáveis vivas (A) mortas (B) e Plasmolisadas (C) dos líquens *Parmotrema tinctorum* e *Usnea barbata* tratados com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Figura 3 – Número médio de células viáveis vivas (A) mortas (B) e Plasmolisadas (C) dos líquens *Parmotrema tinctorum* e *Usnea barbata* tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Figura 4 – Teores de clorofila a, b, total em *U. barbata* (A), Teores de clorofila a, b, total em *P. tinctorum* (B), teores de carotenoides (C) tratadas com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Figura 5 – Teores de clorofila a, b, total em *P. tinctorum* (A), Teores de clorofila a, b, total em *U. barbata* (B), teores de carotenoides (C), razão entre clorofila a e b (D) nos líquens tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Figura 6 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (PHiPo) (A), rendimento quântico do transporte de elétrons (PHIEo). (B),

taxa de captura máxima do FSII (TRo/RC) (C) rendimento quântico (PSIo) (D), índice de desempenho fotossintético (PIABS) (E), fluxo específico de dissipação da energia ao nível das clorofilas da antena (DIo/RC) (F), fluxo específico de absorção de energia luminosa (ABS/RC) (G), observado nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Figura 7 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: taxa de captura máxima do FSII (TRo/RC) (A), rendimento quântico do transporte de elétrons (PHIEo) (B), índice de desempenho fotossintético (PIABS) (C) rendimento quântico do transporte de elétrons (PHIEo) (D), transporte de elétrons por centro de reação (EToRC) (E), fluxo específico de dissipação da energia ao nível das clorofilas da antena (DIo/RC) (F), fluxo específico de absorção de energia luminosa (ABS/RC) (G), observado nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Figura 8 – Atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante dismutase do superóxido (SOD) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e catalase (CAT) (C) observados nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratadas com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Figura 9 – Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e catalase (CAT) (C) observados nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Figura 10 – Concentração de peróxido de hidrogênio H_2O_2 (A) nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Figura 11 – Concentração de peróxido de hidrogênio H_2O_2 (A) nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Capítulo II

Figura 1 – Número médio de células viáveis vivas (A) mortas (B) e Plasmolisadas (C) em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

Figura 2 – Teores de clorofila a, b, total em *P. tinctorium* (A), Teores de clorofila a, b, total em *U. barbata* (B), teores de carotenoides (C), índice de fertilização (D) em função em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

Figura 3 – Valores dos Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

Figura 4 – Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e catalase (CAT) (C) em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

Figura 5 – Concentração de peróxido de hidrogênio H_2O_2 (A) e taxa de liberação de eletrólitos (B) em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

CAPÍTULO I

Biomarcadores da ação do glifosato nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

Resumo

Líquens são ótimos bioindicadores de poluição atmosférica devido as suas características morfológicas e têm sido utilizados durante anos no biomonitoramento ambiental, entretanto, ainda são escassos os trabalhos que utilizam líquens no biomonitoramento de herbicidas como o glifosato utilizados em larga escala pela atividade agrícola. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do glifosato sobre a fisiologia e metabolismo antioxidante sobre duas espécies de líquens comumente encontrados no cerrado goiano, *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*, a fim de avaliar quais seriam os biomarcadores mais sensíveis a serem utilizados no biomonitoramento do glifosato com espécies liquênicas. Ambas as espécies se mostraram sensíveis ao herbicida glifosato, apresentando expressivas alterações, na vitalidade do fotobionte, na integridade dos pigmentos fotossintéticos e no metabolismo antioxidante, constituindo este quesito, biomarcadores eficientes para avaliar o efeito do glifosato sobre espécies liquênicas encontradas em fragmentos florestais que margeiam áreas de agricultura.

Abstract

Lichens are excellent bioindicators of atmospheric pollution due to their morphological characteristics and have been used for years in environmental biomonitoring, however, there are still few works that use lichens in the biomonitoring of herbicides such as glyphosate used on a large scale by agricultural activity. This work aims to evaluate the effects of glyphosate on the physiology and antioxidant metabolism of two lichen species commonly found in the cerrado of Goiás state, *Parmotrema tinctorium* and *Usnea barbata*, to assess which would be the most sensitive biomarkers to be used in glyphosate biomonitoring. with lichen species. Both species were sensitive to the herbicide glyphosate, showing significant changes in photobiont vitality, in the integrity of photosynthetic pigments and in antioxidant metabolism. Constituting this question, efficient biomarkers to evaluate the effect of glyphosate on lichen species found in forest fragments bordering agricultural areas.

Introdução

O cerrado ocupa a cerca de 22% do território nacional, sendo o segundo maior bioma brasileiro é considerado como a savana mais rica em biodiversidade do planeta. É classificado como um dos hotspots para a conservação da biodiversidade pela abundância de espécies biológicas endêmicas, significativa perda de habitats, e grande número de espécies animais e vegetais em de risco de extinção (Del claro & Silingardi, 2019).

A degradação que este bioma vem sofrendo nas últimas décadas está diretamente ligada a intensa atividade agrícola que acontece nesta região, incluindo o uso expressivo de agrotóxicos para o aumento da produtividade, tais como os herbicidas que atingem a vegetação natural próxima as matrizes agrícolas pela deriva (Bohnenblust et al., 2016; Silva et al., 2020).

Durante a aplicação do glifosato pode acontecer o efeito de deriva, que é um problema que pode ser causado por diferentes fatores tais como, a concentração das doses aplicadas, o clima durante a aplicação e o tamanho das partículas pulverizadas. A deriva pode ocasionar efeitos negativos em plantas não alvo como a vegetação ao entorno das lavouras (Londo et al., 2011; Tuffi-Santos et al., 2011).

O glifosato (N-fosfonometil glicina) é herbicida pós-emergência de amplo espectro, não seletivo, amplamente utilizado na agricultura em todo o mundo (Duke & Powles, 2008). O glifosato atua diretamente na inibição da enzima a 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19), que causa desregulação na rota do ácido chiquímico, afetando a biossíntese de proteínas e aminoácidos (Zulet et al., 2013). Esta rota metabólica também está presente em organismos que não são alvos do herbicida tais como fungos, algas e bactérias (Vannini et al., 2015).

A presença de herbicidas como o glifosato no ambiente pode acarretar contaminação ambiental e redução na biodiversidade dos fragmentos florestais em torno das matrizes agrícolas, por causa de sua dispersão e toxicidade em organismos não alvos (Boutin., 2014; Egan et al., 2014; Florencia et al., 2017; Rezende-Silva et al., 2019). Sendo necessário monitorar os efeitos do uso do glifosato em fragmentos vegetacionais do cerrado brasileiro, biomonitoramento é uma maneira prática de se monitorar os níveis de poluição em um ambiente.

O biomonitoramento é baseado na utilização de organismos vivos que respondem a ação de xenobióticos para monitorar a qualidade ambiental da água, solo e ar (Kovalchuk & Kovalchuk, 2008). Para se avaliar o potencial bioindicador de uma espécie são utilizados como parâmetros os biomarcadores da ação da substância sobre o organismo estudado, biomarcadores podem ser alteração fisiológicas, bioquímicas ou morfológicas causadas pelo poluente (Walker., 1998). Esta técnica tem se mostrado uma alternativa eficiente para monitorar os efeitos de herbicidas no meio ambiente (Freitas-Silva et al., 2017; Lima et al., 2017; Batista et al., 2018; Cruz et al., 2021).

Os líquens são associação simbiótica composta fundamentalmente de um fungo e uma alga e / ou cianobactéria (Ahmadjian., 1993). Líquens têm raízes, cutículas protetoras e mecanismos de filtração tanto os nutrientes necessários quanto os elementos tóxicos podem ser absorvidos através de toda a superfície de um talo de líquen (Tyler., 1989). Devido as estas características, eles têm sido utilizados durante anos como bioindicadores da poluição antrópica e monitores da qualidade ambiental (Osyczka & Rola, 2019). Trabalhos que avaliam a toxicidade do glifosato sobre líquens ainda são escassos, provavelmente por serem organismos não alvo e ainda pouco utilizados no monitoramento de herbicidas, contudo existem indicativos que estes organismos podem ser severamente afetados pelo herbicida (McCullin et al., 2012).

Neste trabalho foi levantada a hipótese que os líquens *P. tinctorium* e *U. barbata* possuem sensibilidade ao herbicida glifosato, que poderá provocar significativas alterações na fisiologia fotossintética e metabolismo antioxidante, que serão considerados como biomarcadores da ação do glifosato nestas espécies. Estes biomarcadores serão utilizados como parâmetros para avaliar o potencial bioindicador de cada espécie e servirão como base para posteriores trabalhos com outras espécies liquênicas e glifosato. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar as possíveis alterações causadas pelo glifosato em *P. tinctorium* e *U. barbata* e, assim, definir os melhores bioindicadores da ação desse herbicida e definir seu potencial bioindicador.

Materiais e métodos

Material liquênico e condições experimentais

Duas espécies de líquens amplamente distribuídas e comumente encontradas em áreas de Cerrado foram utilizadas. Como líquen folioso foi utilizado a espécie *Parmotrema tinctorium* e para fruticoso *Usnea barbata*. A coleta de material foi feita em área de preservação permanente, do tipo Cerrado sensu stricto situado na região do planalto verde, município de Caiapônia, coordenadas: 17°19'27,5"S e 51°33'25,3"W. Como líquen folioso foi utilizado a espécie *Parmotrema tinctorium* e para fruticoso *Usnea barbata*.

O experimento consistiu em expor os líquens a um modelo de estresse abiótico. Em laboratório, os líquens foram imersos em diferentes concentrações de soluções de glifosato durante trinta minutos.

Para o experimento foi utilizado quatro concentrações, (a recomendada pelo fabricante do produto (9.6), 10% acima da recomendada (19,2) e 10% menor do que a recomendada (4.8) e

0%.) Como controle foram avaliados líquens das mesmas espécies testadas, mas não expostos aos químicos em questão. Posteriormente, os líquens foram amostrados para prosseguimento das análises fisiológicas em 24, 48 e 72 horas. O delineamento experimental consiste em esquema fatorial duplo: 02 espécies de líquens, 04 concentrações e 03 tempos de amostragem. As análises foram conduzidas em triplicatas, somando 72 unidades experimentais.



Figura 1) Líquens *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale (A) e *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg (B) coletados em área de preservação permanente, do tipo Cerrado sensu stricto.

Respostas Fisiológicas

Viabilidade Celular

Células do fotobionte serão marcadas utilizando o corante vermelho neutro. 100 células foram contadas por amostra em microscópio óptico e classificadas em células vivas, mortas ou plasmolisadas (Zetsche & Meysman, 2012).

Avaliação dos pigmentos fotossintéticos

Foi avaliada a concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b, total, Carotenoides, razão entre Cla/C1b e o índice de feofitização) nos talos. Nos líquens, a alta concentração de substâncias ácidas pode aumentar o índice de feofitização da clorofila, para evitar este efeito, os talos foram previamente lavados em acetona 100% saturada com CaCO₃. A extração dos pigmentos cloroplastídicos foi feita em solução de extração, constituída de DMSO e Polivinilpirrolidona (PVP) a 2,5 mg/ml. Os talos foram cobertos com 5 ml da solução de extração, e os frascos selados e cobertos com papel alumínio, mantidos a 65°C, no escuro, por 40 min. O espectro de absorção foi medido em espectrofotômetro para os comprimentos de onda 665 e 648 nm, com calibração contra o branco contendo apenas solução de extração. A turbidez foi verificada a 750 nm. Nos casos em que o valor foi superior a 0,01 DO, o extrato foi centrifugado (2000 g) por 90 segundos e o sobrenadante, reavaliado. A quantificação dos pigmentos foi feita com base no trabalho e na metodologia de (Lichtenthaler & Wellburn, 1983).

Parâmetros de fluorescência da clorofila

A fluorescência transiente OJIP da clorofila a foi determinada com o uso de fluorômetro portátil FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments; Drasov, Czech Republic). O produto da energia luminosa do centro de reação fotossistema II, foi determinado com o método de saturação por pulso. Foram calculados os fluxos específicos de energia através do centro de reação e rendimentos energéticos, como transporte de elétrons por centro de reação (EToRC), fluxo específico de absorção de energia luminosa (ABS/RC), taxa de captura máxima do FSII (TRo/RC), fluxo específico de dissipação da energia ao nível das clorofilas da antena. Quanto mais alto o valor, maior o estresse. (DIO/RC), índice de desempenho fotossintético (PIABS), rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (PHiPo), rendimento quântico (PSIo) e rendimento quântico do transporte de elétrons (PHIEo) (Strasser et al., 2000)

Atividade de enzimas antioxidantes

Para as análises de quantificação da atividade de enzimas do sistema antioxidante e quantificação do peróxido de hidrogênio, foi utilizado fragmentos dos talos. Todas as amostras foram devidamente coletadas, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a -80°C .

A extração das enzimas foi realizada a partir da maceração de 300 mg de tecido liquênico em nitrogênio líquido com 50% de Polivinilpolipirrolidona (PVP) e procedendo ao protocolo de extração proposto por Biemelt, Keetman e Albrecht (1998), em que o tampão de extração foi composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico a 10 mM. Em seguida, o extrato foi submetido à centrifugação a 13000 g por 10 minutos, a 4°C . Os sobrenadantes, posteriormente obtidos, foram utilizados para avaliar a atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).

A atividade da SOD foi determinada com base na metodologia de Giannopolitis & Ries (1977), em que é avaliada a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). Para tanto, uma alíquota do extrato enzimático foi incubada em um meio contendo 50 mM de fosfato de potássio pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM e riboflavina 2 μM . As amostras, juntamente com o meio de incubação, foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W durante 7 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. A atividade da SOD foi determinada em U mg^{-1} proteína, em que 1U corresponde a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT.

Para avaliar a atividade da CAT foi utilizada metodologia proposta por Havir & McHale (1987). Diante disso, uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), e peróxido de hidrogênio 12,5 mM. A atividade da enzima foi determinada com base no consumo de H_2O_2 a cada 15 segundos, por 3 minutos, a 240 nm em espectrofotômetro. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da CAT foi determinada em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da APX foi avaliada com base na metodologia de Nakano & Asada (1981), acompanhada da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, durante 3 minutos. Desse modo, uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada a um meio contendo tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio 0,1 mM. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da APX foi determinada em $\mu\text{mol AsA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Para a quantificação de H_2O_2 200 mg de tecido do talo foram macerado em nitrogênio líquido e PVPP, sendo homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 10000 g por 15 minutos, a 4°C . A concentração de H_2O_2 foi obtida por espectrofotometria de acordo com Velikova, Yordanov e Edreva (2000).

Análises estatísticas

Os dados obtidos a partir de cada variável resposta foram submetidos a análise de variância para se verificar possível efeito na espécie, das doses, do tempo e da interação entre tempo x dose sobre a resposta dos líquens avaliados. O programa utilizado para analisar os dados foi o SISVAR®. O programa utilizado na montagem dos gráficos foi o Sigmaplot.

Resultados e discussão

Efeitos significativos das doses de glifosato foram observados em *P. tinctorium* e *U. barbata* nas médias de células vivas e mortas (respectivamente, $F = 276.511$; $p = 0.0000$, $F = 18.539$; $p = 0.0000$, $F = 14.884$; $p = 0.0000$). Apenas *U. barbata* foi afetada pela dose na média de células plasmolisadas ($F = 3.540$; $p = 0.0297$). O tempo de exposição afetou as médias de células vivas e mortas em *P. tinctorium* ($F = 20.527$; $p = 0.0000$, $F = 32.193$; $p = 0.0000$), o tempo também afetou a média de células plasmolisadas em *U. barbata* ($F = 11.413$; $p = 0.0003$). Quanto a viabilidade das células algais, em *P. tinctorium* foi observado efeito linear para a vitalidade do fotobionte no número de células vivas e mortas em relação ao tempo e dose respectivamente, havendo menor número médio de células vivas (45 e 8,88) e maior número médio de células mortas (51,83 e 87, 55) nos talos expostos ao período mais longo de exposição e na concentração mais alta de glifosato. Para *U. barbata* foi observado efeito linear no número de células vivas, mortas e plasmolisadas em relação a dose, havendo menor número médio de células vivas (33,88), maior número médio de células mortas (59,55), maior número de células plasmolisadas (6,55) na concentração mais alta de glifosato, e não foi observado homogeneidade no efeito do tempo no número de células plasmolisadas (figuras 1 e 2). Líquens não possuem estruturas que possam selecionar a entrada de elementos ou eliminar elementos indesejáveis, sendo assim a absorção praticamente automática após a exposição. O número viável de células mortas foi aumentando de forma crescente, quanto maior a concentração das doses e mais longo o tempo de exposição, o que sugere que esse herbicida foi expressivamente tóxico às células algais. Neste trabalho foi verificado a degradação de pigmentos cloroplásticos em ambas as espécies trabalhadas podendo explicar o aumento no número de células algais mortas em relação as doses e tempos. O glifosato é o único herbicida capaz de garantir alto nível de inibição da enzima EPSPS (5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase), que está envolvida na biossíntese de importantes aminoácidos aromáticos para plantas, este herbicida também pode ser tóxico a organismos não alvos como as algas do fotobionte já que a via do shikimato também está presente nestes organismos (Vannini et al., 2016).

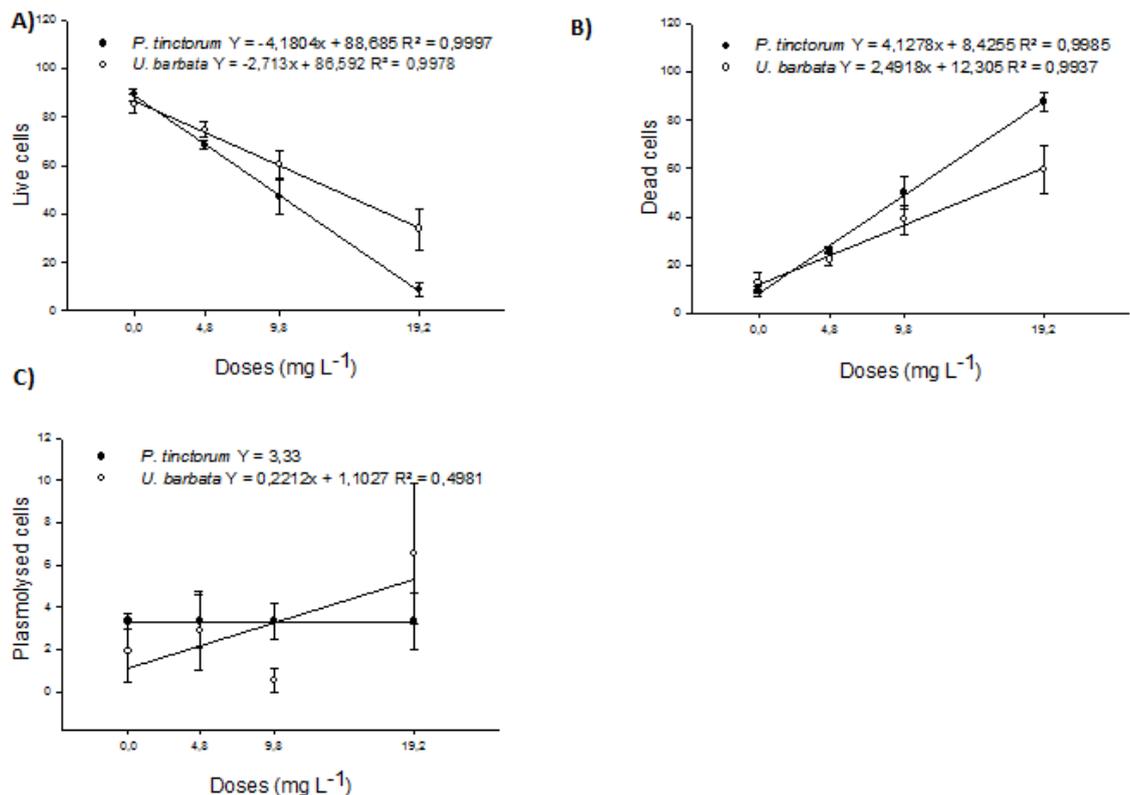


Figura 2) Número médio de células viáveis vivas (A) mortas (B) e Plasmolisadas (C) dos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

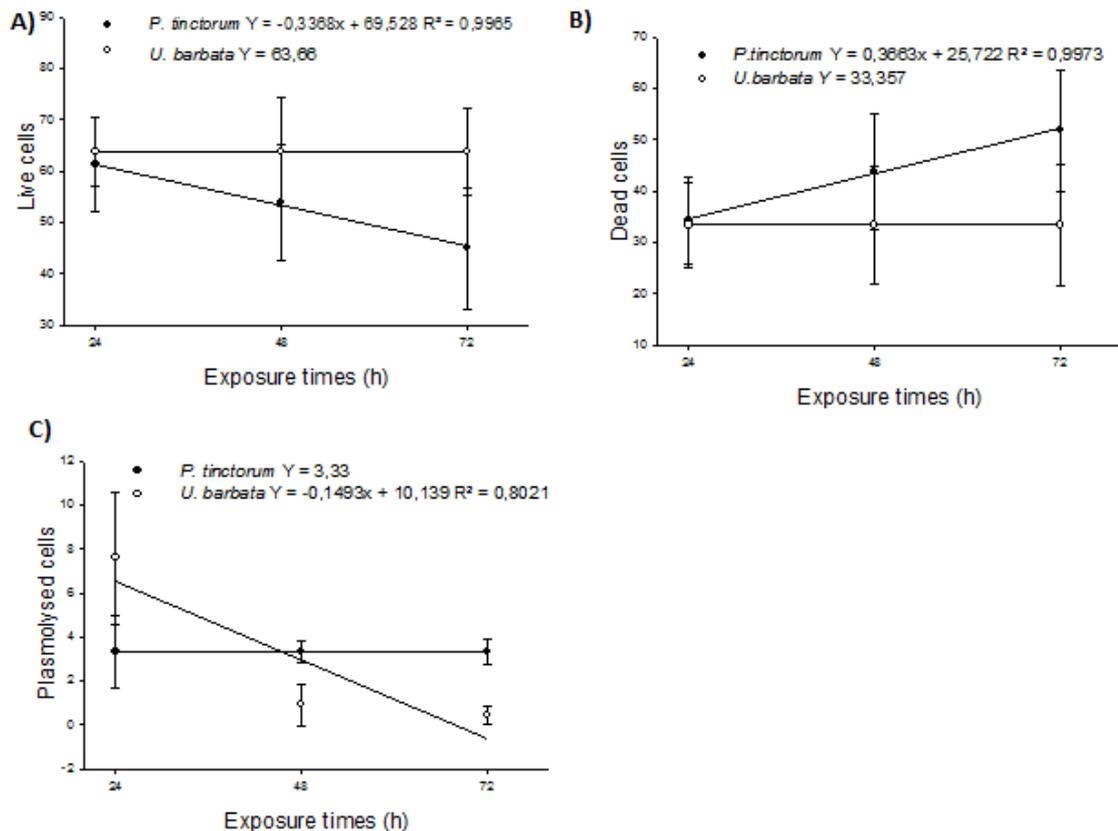


Figura 3) Número médio de células viáveis vivas (A) mortas (B) e Plasmolisadas (C) dos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Em *P. tinctorium* as doses de glifosato aplicadas tiveram efeito somente na razão entre Cla/C1b ($F = 10.443$; $p = 0.0005$), em *U. barbata* as doses afetaram os teores de clorofila a, clorofila total e carotenoides (respectivamente $F = 5.429$; $p = 0.0054$, $F = 5.978$; $p = 0.0034$, $F = 5.978$; $p = 0.0034$). Em relação aos tempos de exposição *P. tinctorium* sofreu efeito nos teores de clorofila a, b, total e carotenoides (respectivamente $F = 3.973$; $p = 0.0323$, $F = 4.992$; $p = 0.0154$, $F = 4.634$; $p = 0.0199$, $F = 10.443$; $p = 0.0005$). Em relação a concentração de pigmentos fotossintetizantes, para a espécie *P. tinctorium* foi observado efeito linear do tempo sobre os teores de clorofila a, b, total e carotenoides, havendo maior concentração destes pigmentos no primeiro tempo (2120, 3989, 6109 e 323) e maior degradação no segundo tempo (1157, 2007, 3164 e 149). Para *U. barbata* não foi observado homogeneidade no efeito das doses nos teores de clorofila a, total e carotenoides, havendo maior concentração deste pigmentos na segunda dose (1147, 3612 e 315) e maior degradação na quarta dose (1142, 3075 e 174) (figuras 3 e 4). Apesar de ser observado a degradação dos teores de clorofila a e b em ambas as espécies, o nível de degradação foi relativamente baixo quando comparado a degradação de carotenoides, e possível que este pigmento protetor tenha sido mais afetado pela exposição ao herbicida e reduzindo o contato dos demais pigmentos ao glifosato na camada do fotobionte. Vannini et al (2015) demonstrou em seu trabalho com o líquen *Xanthoriaparietina* (L.) Th. Fr que o glifosato pode degradar a clorofila a dependendo das concentrações aplicadas e do tempo de exposição utilizando

a mesma metodologia deste experimento. Gomes et al, (2016) relatam em seu trabalho que o glifosato promove estresse oxidativo e consequentemente diminui os teores de clorofila na planta *Arachis hypogaea* L. Este herbicida causa diminuição dos teores de pigmentos fotossintéticos e redução nas taxas fotossintéticas e respiratórias (Ding et al., 2011). Diminuição na concentração de pigmentos fotossintéticos é efeito fitotóxico amplamente observado em plantas tratadas com glifosato (Huang et al., 2012; Radwan., 2016). O glifosato pode ter efeitos danosos tanto na degradação quanto na síntese de clorofilas (Zobiolo et al., 2011).

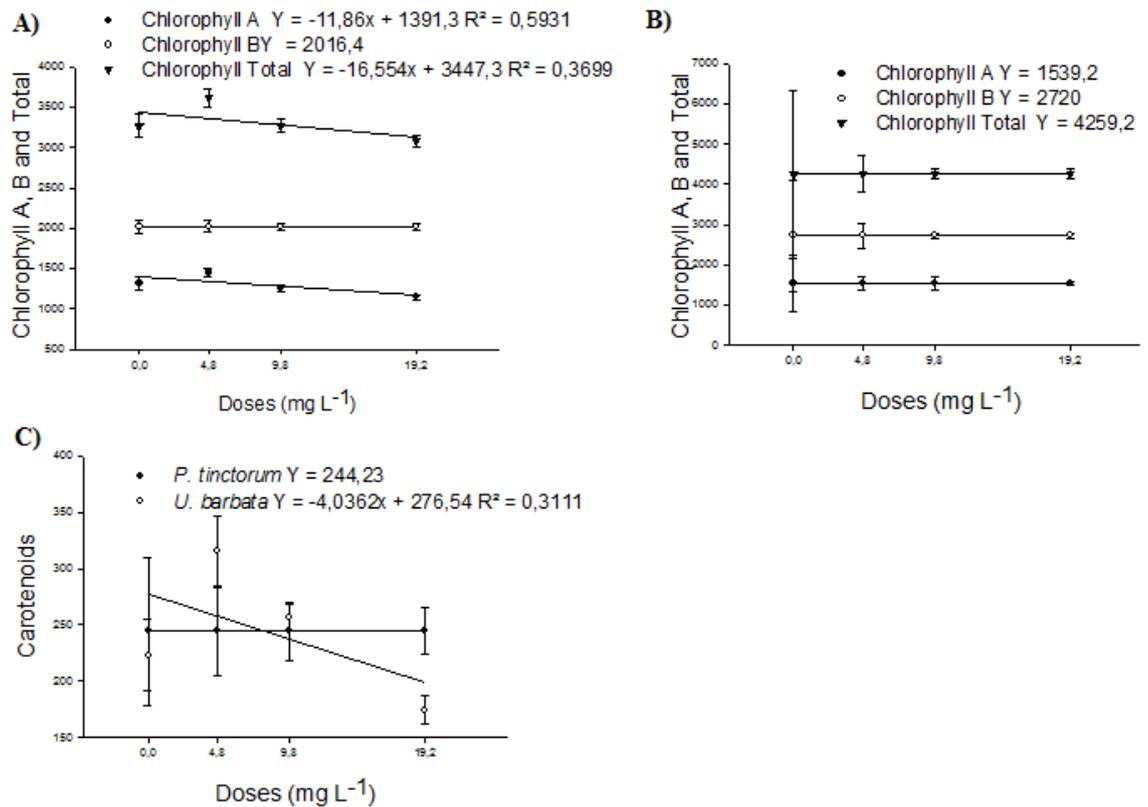


Figura 4) Teores de clorofila a, b, total em *U. barbata* (A), Teores de clorofila a, b, total em *P. tinctorum* (B), teores de carotenoides (C) tratadas com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

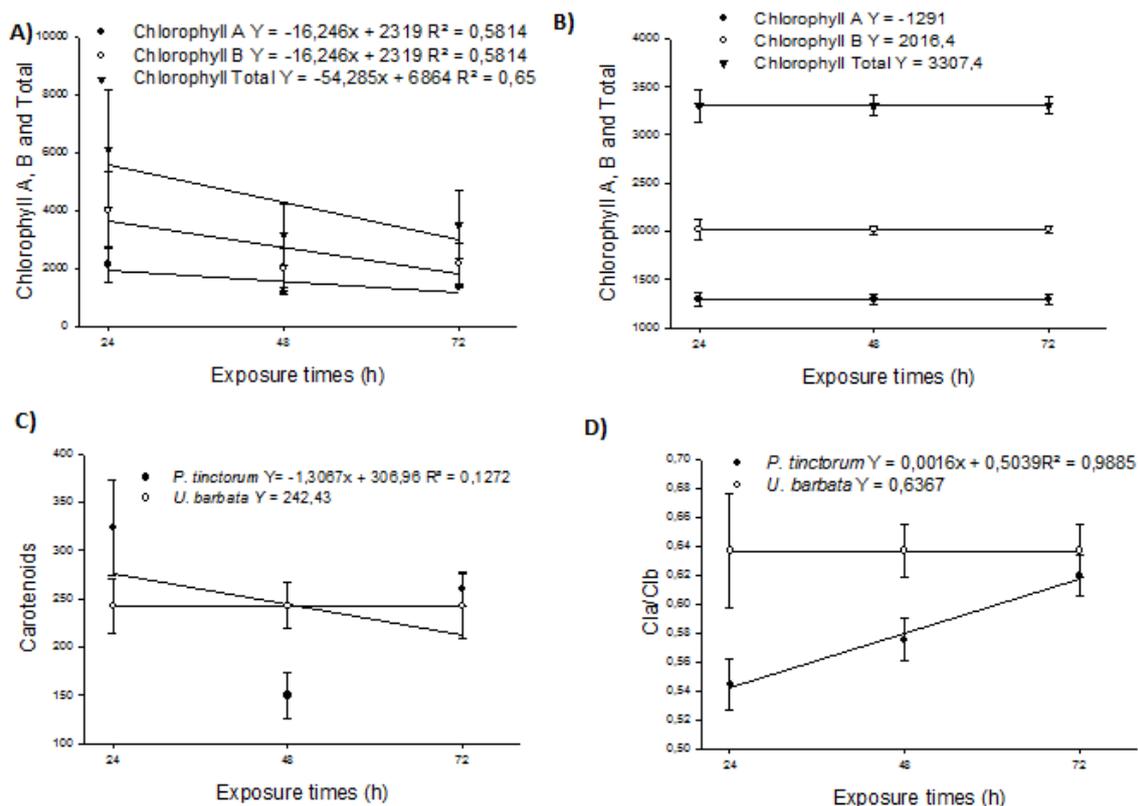


Figura 5) Teores de clorofila a, b, total em *P. tinctorium* (A), Teores de clorofila a, b, total em *U. barbata* (B), teores de carotenoides (C), razão entre clorofila a e b (D) nos líquens tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Nos parâmetros fotoquímicos da fluorescência de clorofila houve efeito das doses sobre *P. tinctorium* e *U. barbata* respectivamente nos parâmetros PHiPo ($F = 8.464$; $p = 0.0005$ e $F = 18.585$; $p = 0.0000$), PSiO ($F = 5.583$; $p = 0.0047$ e $F = 0.741$; $p = 0.0244$), PHIEo ($F = 7.908$; $p = 0.0008$ e $F = 12.103$; $p = 0.0000$), PIABS ($F = 8.138$; $p = 0.0006$ e $F = 10.417$; $p = 0.0001$), ABS/RC ($F = 6.722$; $p = 0.0019$ e $F = 14.850$; $p = 0.0000$), TRo/RC ($F = 4.885$; $p = 0.0086$ e $F = 4.985$; $p = 0.0079$), DIo/RC ($F = 8.248$; $p = 0.0006$ e $F = 15.445$; $p = 0.0000$), EToRC apenas foi afetado em *U. barbata* ($F = 4.985$; $p = 0.0079$). Quanto aos tempos de exposição foi observado em *P. tinctorium* efeito do tempo sobre PSiO ($F = 4.537$; $p = 0.0213$), PHIEo ($F = 4.348$; $p = 0.0245$), PIABS ($F = 3.321$; $p = 0.0533$), ABS/RC ($F = 3.772$; $p = 0.0376$), TRo/RC ($F = 4.484$; $p = 0.0221$) (Figuras 5 e 6).

Quanto aos parâmetro fotoquímicos foi possível observar em *P. tinctorium* e *U. barbata* declínio linear nos valores do Índice de desempenho fotossintético (PIABS) em relação a dose, sendo o menor valor em ambas espécies encontradas na maior dose, em relação aos tempos de exposição foi observado aumento linear em *P. tinctorium*, sendo o maior valor encontrado no maior tempo, o aumento deste parâmetro é incomum e organismos expostos a estresses abióticos, é pouco provável que os líquens tenha desenvolvido resiliência devido ao curto período de exposição, o período de exposição foi relativamente curto para que o sistema de defesa antioxidante tenha atuado para reduzir os danos celulares e aumentado o desempenho fotossintético. O parâmetro PIABS combina em uma única expressão as três etapas funcionais da atividade fotossintética (absorção de luz, captura de energia de excitação, e conversão de energia de excitação em transporte de elétrons), resultando em indicador muito sensível de estresse, adequado para ser aplicado para rastreios fisiológicos (Fačková et al., 2020).

Foi observado também aumento linear nos valores do fluxo específico de absorção de energia luminosa (ABS/RC) e no Fluxo específico de dissipação da energia (DIo/RC), em ambas as espécies em relação a dose, sendo os maiores valores encontrados na dose mais alta. Em *P.*

tinctorium e / foi observado um declínio nos valores de ABS/RC e DIo/RC respectivamente em relação ao tempo. DIo/RC é um indicativo de estresse sendo que quanto mais alto o valor, maior o estresse. O aumento significativo de ABS/RC e DIo/RC é frequentemente citado como mecanismo para se evitar danos oxidativos (Malaspina et al., 2015; Pollastrini et al., 2011).

Observou-se aumento linear não homogêneo nos valores do fluxo de elétrons por centro de reação (EToRC) em relação ao tempo. Para o rendimento quântico (PSIo) foi observado em ambas as espécies declínio linear em relação as doses tendo seus menores valores na dose mais alta, em relação ao tempo se observou em *P. tinctorium* aumento linear não homogêneo. Houve também diminuição linear nos valores do rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (PHiPo) em ambas as espécies em relação as doses. Quanto ao rendimento quântico do transporte de elétrons (PHIEo), houve declínio linear em ambas as espécies em relação ao tempo, sendo os valores mais baixos os das doses mais altas, para *P. tinctorium* foi encontrado aumento linear nos valores em relação aos tempos. A taxa de captura máxima do FSII (TRo/RC), apresentou aumento linear não homogêneo para ambas as espécies, e diminuição linear em *P. tinctorium* em relação ao tempo.

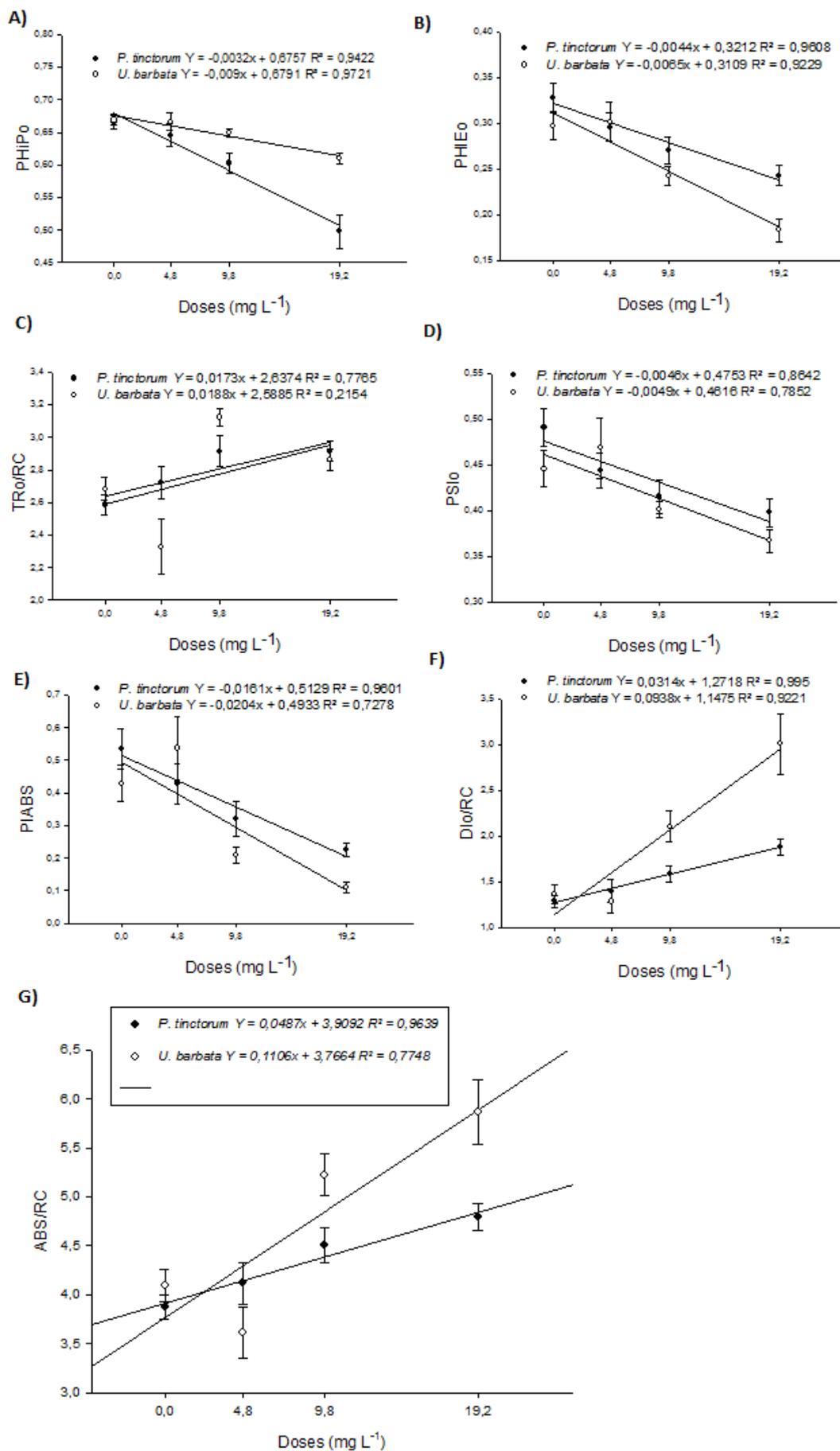


Figura 6) Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (PHiPo) (A), rendimento quântico do transporte de elétrons (PHIEo). (B), taxa de captura máxima do FSII (TRo/RC) (C) rendimento quântico (PSIo) (D), índice de desempenho fotossintético (PIABS) (E), fluxo específico de dissipação da energia ao nível das clorofilas da antena (Dio/RC) (F), fluxo específico de absorção de energia luminosa (ABS/RC) (G), observado nos líquens *Parmotrema tinctorum* e *Usnea barbata* tratados com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

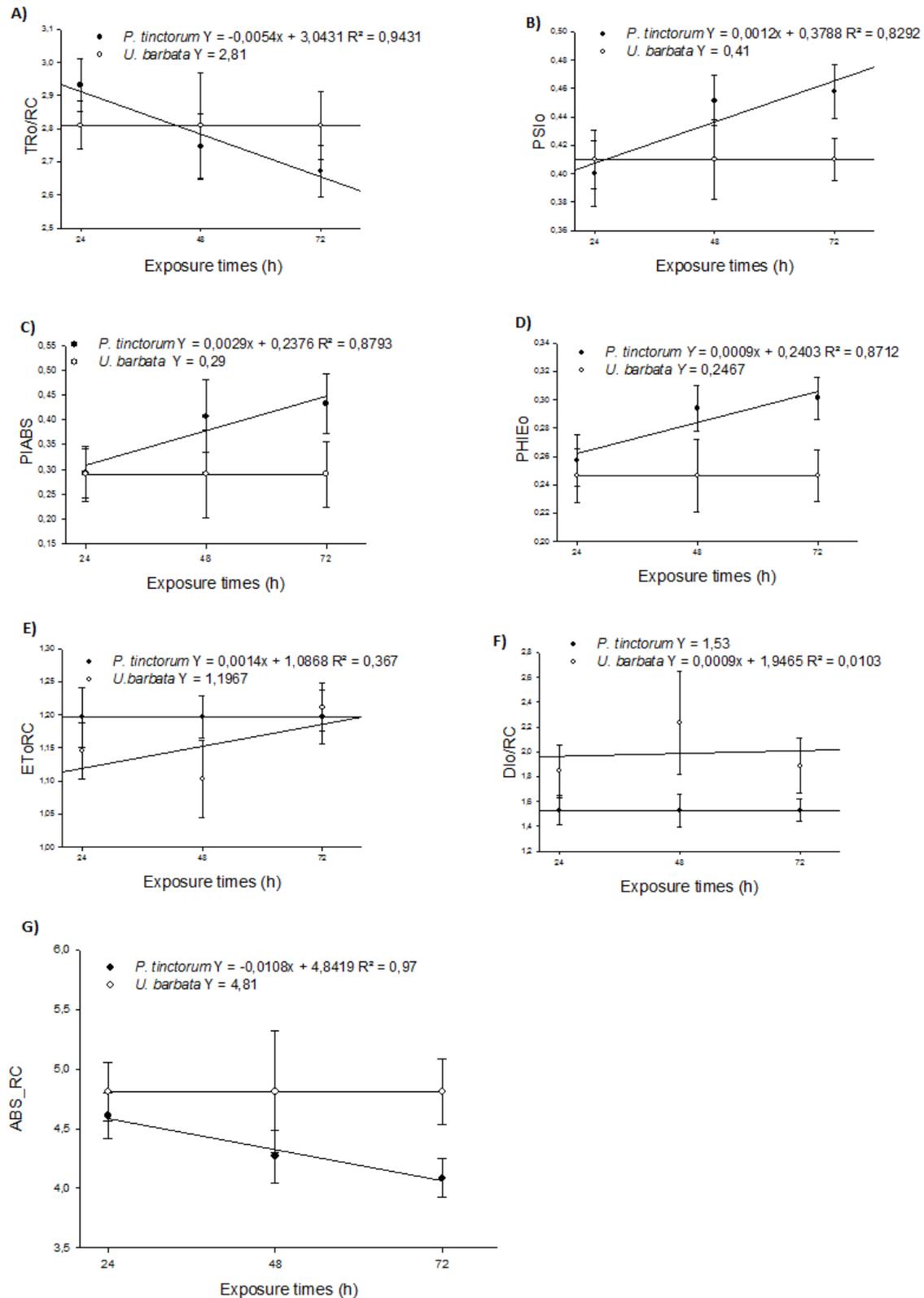


Figura 7) Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: taxa de captura máxima do FSII (TRo/RC) (A), rendimento quântico do transporte de elétrons (PHIEo) (B), índice de desempenho fotossintético (PIABS) (C) rendimento quântico do transporte de elétrons (PHIEo) (D), transporte de elétrons por centro de reação (EToRC) (E), fluxo específico de dissipação da energia ao nível das clorofilas da antena (DIo/RC) (F), fluxo específico de absorção de energia luminosa (ABS/RC) (G), observado nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Para a espécie *U. barbata* foi observado efeito do tempo e da dose respectivamente sobre as enzimas SOD ($F = 0.000$; $p = 0.0000$ e $F = 0.592$; $p = 0.0000$), APX ($F = 0.000$; $p = 0.0000$ e $F = 0.000$; $p = 0.0000$), CAT ($F = 1.0E+0009$; $p = 0.0000$ e $F = 1.0E+0009$; $p = 0.0000$), e sobre o peróxido de hidrogênio ($F = 0.000$; $p = 0.0000$ e $F = 6718.808$; $p = 0.0000$). Na espécie *P. tinctorium* foi observado efeito do tempo sobre as enzimas SOD ($F = 0.000$; $p = 0.0000$), APX ($F = 0.000$; $p = 0.0000$), CAT, ($F = 0.000$; $p = 0.0000$), e no peróxido de hidrogênio ($F = 0.000$; $p = 0.0000$). Em ambas as espécies foi observado aumento linear na atividade de SOD e APX em relação aos tempos de exposições e redução linear na atividade de CAT. Em relação as doses aplicadas foi observado aumento linear em *U. barbata* nas atividades de SOD, APX e CAT (Figura 7 e 8). Em *U. barbata* houve redução linear sobre o peróxido de hidrogênio em relação aos tempos e doses, *P. tinctorium* apresentou aumento linear no peróxido de hidrogênio em relação ao tempo (Figura 9 e 10).

Glifosato pode induzir o estresse oxidativo em plantas (Gomes et al., 2014). A aplicação deste herbicida pode alterar as fases fotoquímicas da fotossíntese, provocando o excesso de elétrons livres no cloroplasto e consequentemente causando aumento na produção de ROS (Mateos-Naranjo & Perez-Martin, 2013). O aumento de SOD em *P. tinctorium* e *U. barbata* indica a dismutação de superóxido (O_2^-) em H_2O_2 , que também é um subproduto tóxico, apesar de seu importante papel como sinalizador (Gupta et al., 2016), a total desintoxicação celular também depende da ação das enzimas CAT e APX que degradam H_2O_2 em água e oxigênio, usando ascorbato como substrato (Sharma et al., 2012). A redução da atividade de CAT em ambas as espécies em relação ao tempo de exposição pode estar relacionada com os processos de regulação pós transcricional e pós traducional em que a enzima pode ter tido sua síntese reduzida ou estrutura funcional comprometida, deixando de ser uma enzima (Mazzucotelli et al., 2008).

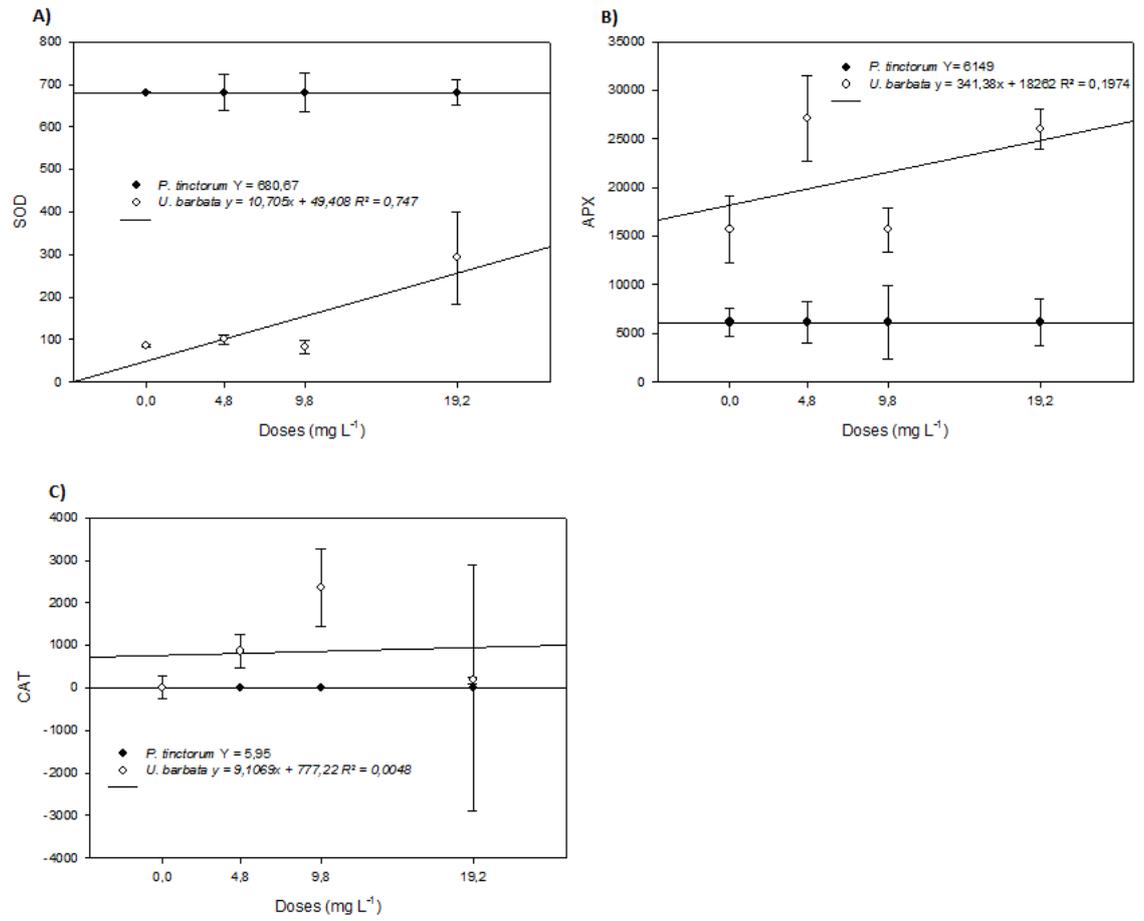


Figura 8 – Atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante dismutase do superóxido (SOD) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e catalase (CAT) (C) observados nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratadas com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

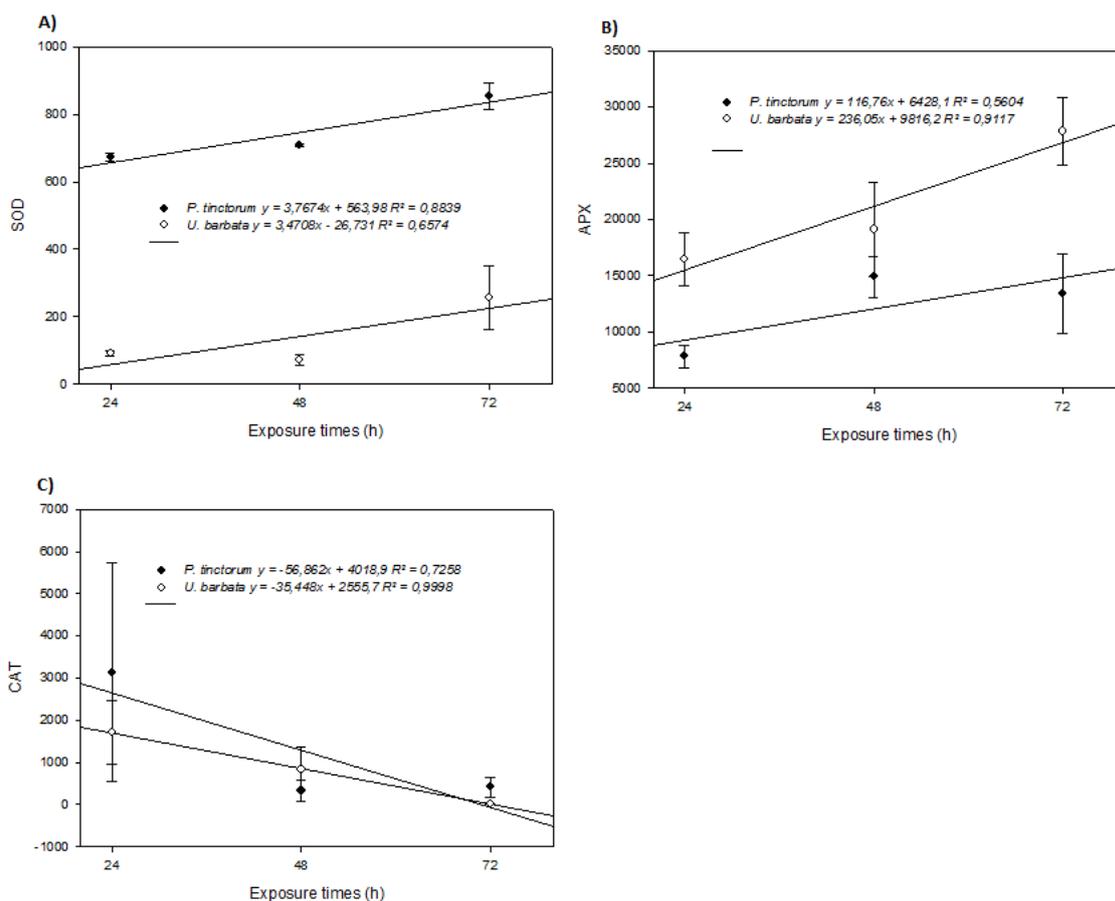


Figura 9 – Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e catalase (CAT) (C) observados nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

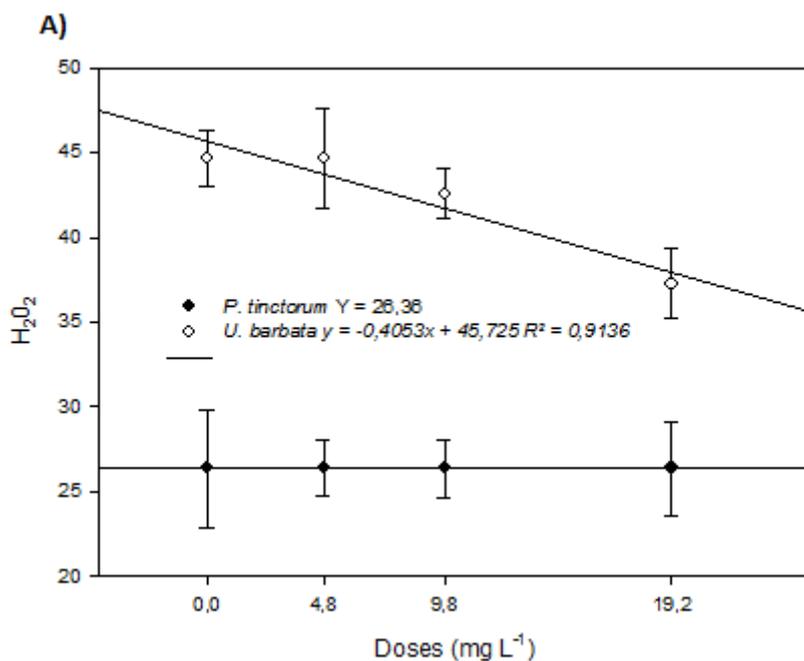


Figura 10 – Concentração de peróxido de hidrogênio H₂O₂ (A) nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

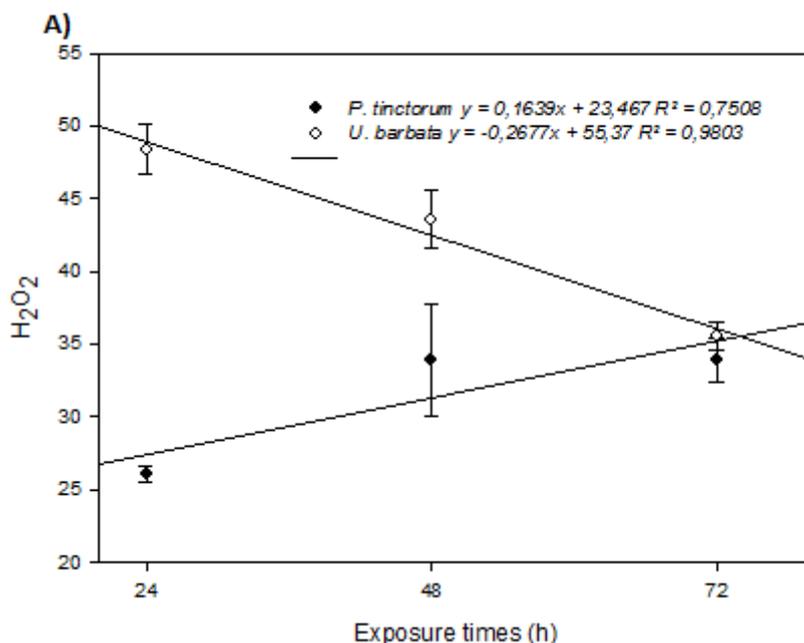


Figura 11 – Concentração de peróxido de hidrogênio H₂O₂ (A) nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

Conclusão

Este estudo demonstrou que ambas as espécies de líquens avaliadas são sensíveis ao herbicida glifosato, que afeta a vitalidade das células algais e compromete a eficiência fotoquímica e metabolismo antioxidante em *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*, sendo que os parâmetros utilizados são bons biomarcadores da ação do glifosato em líquens, sendo também promissores biomarcadores para serem utilizados como referência em diferentes trabalhos utilizando líquens.

Referências Bibliográficas

- Ahmadjian, V., (1993). The Lichen Symbiosis. **John Wiley & Sons, Inc, Nova York.**
- Batista, P. F., Costa, A. C., Megguer, C. A., Lima, J. S., Silva, F. B., Guimarães, D. S., ... Nascimento, K. J. T. (2017). Pouteria torta: a native species of the Brazilian Cerrado as a bioindicator of glyphosate action. **Brazilian Journal of Biology.**
- Biemelt, S.; Keetman, U.; Albrecht, G. (1998) Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology.**
- Bohnenblust EW, Vaudo AD, Egan JF, Mortensen DA, Tooker JF (2016) Effects of the herbicide dicamba on nontarget plants and pollinator visitation. **Environ Toxicol Chem.**
- Boutin, C., Strandberg, B D., S.K.D., Mathiassen, P.J. T (2014) Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications?, **Environ. Pollut.**

Cruz, C. E. S., de Freitas-Silva, L., Ribeiro, C., & da Silva, L. C. (2021). Physiological and morphoanatomical effects of glyphosate in *Eugenia uniflora*, a Brazilian plant species native to the Atlantic Forest biome. **Environmental Science and Pollution Research**.

De Freitas-Silva, L., de Araújo, T. O., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, C., Costa, A. C., & da Silva, L. C. (2020). Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. **Ecological Indicators**.

Del-claro K, Torezan-silingardi HM (2019) The study of biotic interactions in the Brazilian Cerrado as a path to the conservation of biodiversity. **An Acad Bras Cienc**.

Ding, W., Reddy, K. N., Zablotowicz, R. M., Bellaloui, N., & Arnold Bruns, H. (2011). Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. **Chemosphere**.

Duke, S.O; Powles, S.B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**.

Egan, JF Bohnenblust, E Goslee, S Mortensen, D Tooker, J (2014) Herbicide drift can affect plant and communities. **Agriculture, Ecosystems & Environment**.

Fačková Z, Vannini A, Monaci F, Grattacaso M, Paoli L, Loppi S. Effects of wood distillate (pyroligneous acid) on sensitive bioindicators (lichen and moss). **Ecotoxicol Environ Saf**.

Florencia, F. M., Carolina, T., Enzo, B., & Leonardo, G. (2017). Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). **Ecotoxicology and Environmental Safety**.

Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**.

Gomes, M. P., Juneau, P., 2016. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide?. **Environmental Pollution**.

Gomes, M. P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., ... Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**.

Gupta, K., Sengupta, A., Chakraborty, M., & Gupta, B. (2016). Hydrogen Peroxide and Polyamines Act as Double Edged Swords in Plant Abiotic Stress Responses. **Frontiers in Plant Science**.

Havir, E. A.; Mchale, N. A. (1987.) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**.

Huang, J., Silva, E.N., Shen, Z., Lu, H. 2012. Effects of glyphosate on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and physicochemical properties of cogongrass (*Imperata cylindrical* L.) **Plant Omics**.

Kovalchuk, I., & Kovalchuk, O. (2008). Transgenic Plants as Sensors of Environmental Pollution Genotoxicity. **Sensors**.

Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochem. Soc. Trans**.

- Lima, D. A. de, Müller, C., Costa, A. C., Batista, P. F., Dalvi, V. C., & Domingos, M. (2017). Morpho Anatomical and physiological changes in *Bauhinia variegata* L. as indicators of herbicide diuron action. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.
- Londo JP, Bollman MA, Sagers CL, Lee EH, Watrud LS (2011) Glyphosate -drift but not herbivory alters the rate of transgene flow from single and stacked trait transgenic canola (*Brassica napus*) to non-transgenic *B. napus* and *B. rapa*. **New Phytologist**
- Malaspina, P., Giordani, P., Pastorino, G., Modenesi, P., Mariotti, M.G., 2015. Interaction of sea salt and atmospheric pollution alters the OJIP fluorescence transient in the lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. **Ecol. Indic.**
- Mateos-Naranjo, E., & Perez-Martin, A. (2013). Effects of sub-lethal glyphosate concentrations on growth and photosynthetic performance of non-target species *Bolboschoenus maritimus*. **Chemosphere**,
- Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Crosatti, C., Guerra, D., Stanca, A. M., & Cattivelli, L. (2008). Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**.
- McMullin, R. T., Wayne Bell, F., & Newmaster, S. G. (2012). The effects of triclopyr and glyphosate on lichens. **Forest Ecology and Management**.
- Nakano, Y.; Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**.
- Osyczka, P., & Rola, K. (2019). Integrity of lichen cell membranes as an indicator of heavy-metal pollution levels in soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.
- Pollastrini, M., Di Stefano, V., Ferretti, M., Agati, G., Grifoni, D., Zipoli, G., Orlandini, S., Bussotti, F., 2011. Influence of different light intensity regimes on leaf features of *Vitis vinifera* L. in ultraviolet radiation filtered condition. **Environ. Exper. Bot.**
- Radwan, D.E.M., Fayez, K.A., 2016. Photosynthesis, antioxidant status and gas-exchange are altered by glyphosate application in peanut leaves. **Photosynthetica**.
- Rezende-Silva, S. L., Costa, A. C., Dyszy, F. H., Batista, P. F., Crispim-Filho, A. J., Nascimento, K. J. T., & da Silva, A. A. (2019). *Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation. **Ecological Indicators**.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**.
- Silva FB, Costa AC, Müller C, Nascimento KT, Batista PF, Vital RG, Megguer CA, Jakelaitis A, Domingos M. (2020) *Dipteryx alata*, a tree native to the Brazilian Cerrado, is sensitive to the herbicide nicosulfuron. **Ecotoxicology**.
- Strasser, R.J.; Srivastava, A.; Tsimilli-Michael, M. (2000) The fluorescence transient the a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*; Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P., Eds.; Taylor and Francis: New York, NY, USA; pp. 445–483.

Tuffi-Santos LD, Graça RN, Alfenas AC, Ferreira FA, Melo CAD, Machado MS (2011) Glyphosate reduces urediniospore development and Puccinia psidii disease severity on Eucalyptus grandis. **Pest Management Science**.

Tyler, G. (1989). Uptake, retention and toxicity of heavy metals in Lichens. **Water, Air, and Soil Pollution**.

Vannini A, Guarnieri M, Bačkor M, Bilová I, Loppi S (2015) Uptake And Toxicity Of Glyphosate in the lichen Xanthoria parietina (L.) Th. Fr. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.

Vannini A, Guarnieri M, Bačkor M, Bilová I, Loppi S. Uptake and toxicity of glyphosate in the lichen Xanthoria parietina (L.) Th. Fr. **Ecotoxicol Environ Saf**.

Vannini A, Guarnieri M, Paoli L, Sorbo S, Basile A, Loppi S. Bioaccumulation, physiological and ultrastructural effects of glyphosate in the lichen Xanthoria parietina (L.) Th. Fr. **Chemosphere**.

Velikova, V.; Yordanov, I.; Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**.

Zetsche, E. M., Meysman, F. J. R. (2012) Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. **J. Plankton Res**.

Zobiolo, L. H., Kremer, R. J., Oliveira, R. S., Constantin, J., 2011. Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**.

Zulet, A. Gil-Monreal., Villamor, J. G., Zabalza, A., Renier A. L., Hoorn., (2013) Proteolytic Pathways Induced by Herbicides That Inhibit Amino Acid Biosynthesis. **Plos One**.

CAPÍTULO II

Avaliação do potencial bioindicador dos líquens *Parmotrema Tinctorium* e *Usnea barbata* a chuva simulada de cádmio.

Resumo

Cádmio (Cd) é um metal pesado tóxico não essencial que pode afetar o meio ambiente e é difundido na natureza através da atividade antrópica. Na agricultura Cd compõem a formulação de diversos produtos que podem derivar de matrizes agrícolas para fragmentos florestais e impactar a vegetação nativa. Este trabalho se propõe a avaliar alterações fisiológicas e bioquímicas causadas por diferentes concentrações do metal pesado cádmio a duas espécies de líquens comumente encontrados em fragmentos de Cerrado, as espécies *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*. O propósito é identificar a espécie mais sensível, de forma a gerar uma perspectiva para sua utilização no biomonitoramento da dispersão de poluentes agrícolas. Em nenhuma das espécies estudadas apresentou alterações no desempenho fotossintético, a integridade dos pigmentos apresentou efeito não homogêneo em ambas as espécies, a vitalidade e metabolismo antioxidante demonstram alterações expressivas e podem ser utilizados como indicadores de sensibilidade em ambas as espécies.

CHAPTER II

Evaluation of the potential bioindicator of *Parmotrema Tinctorium* and *Usnea barbata* lichens to simulated cadmium rain.

Abstract

Cadmium (Cd) is a non-essential toxic heavy metal that can affect the environment and is diffused in nature through human activity. In agriculture, Cd comprise the formulation of several products that can derive from agricultural matrices for forest fragments and impact native vegetation. This

work aims to evaluate physiological and biochemical changes caused by different concentrations of the heavy metal cadmium to two lichen species commonly found in Cerrado fragments, *Parmotrema tinctorium* and *Usnea barbata*. The purpose is to identify the most sensitive species, to generate a perspective for its use in the biomonitoring of the agricultural pollutants dispersion. In none of the studied species showed changes in photosynthetic performance, the integrity of the pigments showed a non-homogeneous effect in both species, also the vitality and antioxidant metabolism show significant changes and can be used as indicators of sensitivity in both species.

Introdução

Elevados níveis de metais pesados no meio ambiente pode representar perigo para a biota por seus efeitos adversos em praticamente todos os organismos vivos, tornando um problema para preservação da biodiversidade pelos poluentes que se acumulam em toda a cadeia trófica (Melo et al., 2009). O Cd é um elemento tóxico não essencial difundido no meio ambiente por diversas atividades antrópicas tais como, incineração de resíduos, produtos residuais providos da indústria metalúrgica e mineradora, tráfico urbano e como subproduto de fertilizantes fosfatados (Toppi et al. 2007).

O Cd é um elemento fitotóxico, pois apesar de ser um elemento não essencial ao desenvolvimento vegetal, seus íons são facilmente absorvidos pelas raízes e transportados para a parte aérea da planta, afetando o crescimento, atividade fotossintética e nutrição (Mirsha & Thipathi, 2008). Diversos estudos têm demonstrado que Cd causa diminuição da transpiração e da fotossíntese, aumento da taxa respiratória, clorose foliar, inibição do crescimento de raízes e da parte aérea e redução no acúmulo de matéria seca (Schützendübel et al., 2001; Soltan & Rashed, 2003; Vecchia et al., 2005). O Cd interfere em muitas funções celulares, principalmente pela formação de complexos com grupos externos de compostos orgânicos, tais como as proteínas, resultando na inibição de atividades essenciais (Metwally et al., 2003). Além disso, pode induzir a peroxidação lipídica e provocar alterações nos sistemas antioxidantes, gerando estresse oxidativo (Hegedus et al., 2004, Hassan & Mansoor, 2014).

Uma das maneiras de prever os efeitos deste elemento nos organismos vivos e meio ambiente é através do biomonitoramento, uma metodologia que pode fornecer informações sobre níveis de poluição em diferentes ecossistemas (Silva et al., 2013). Os líquens são organismos simbióticos que consistem na associação de um micobionte e um fotobionte, resultando na formação de um talo (Hawksworth & Hill, 1984). Líquens não apresentam raízes em sua anatomia e por isso sua nutrição mineral depende principalmente da atmosfera, líquens também são capazes de acumular em seu talo mais elementos minerais do que necessitam, estas características combinadas os tomam excelentes bioindicadores (Carreras & Pignata, 2007).

Muitos trabalhos mostram que diversos metais pesados podem interferir na fisiologia de diferentes espécies de líquens, principalmente na integridade da clorofila e na atividade fotossintética do componente algal (Dzubaj et al. 2008). Os metais pesados a nível celular causam estresse oxidativo resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), em líquens a peroxidação lipídica é geralmente quantificada por níveis aumentados de MDA (Monnet et al., 2006).

Diversos tipos de fertilizantes utilizados na agricultura, por exemplo, além dos elementos essenciais e desejáveis, levam metais pesados como arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg) e cromo (Cr) na sua formulação (Nava et al. 2011; Gonçalves Junior & Pessoa, 2002). Fertilizantes e agrotóxicos, bem como seus derivados podem se dispersar para fragmentos florestais impactando as comunidades biológicas (Palharini et al. 2021). Como algumas espécies de líquens são mais sensíveis a determinados poluentes, é preciso se conhecer espécies estratégicas, que possam ser utilizadas, sobretudo em áreas de intensa agricultura para bioindicar a emanção destes agroquímicos a partir das áreas de cultivo. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a sensibilidade de duas espécies liquênicas comumente encontradas no Cerrado à ação do metal pesado cádmio, visando o conhecimento de espécies estratégicas que bioindicuem a dispersão deste poluente agrícola para fragmentos vegetacionais deste bioma.

Materiais e métodos

Material liquênico e condições experimentais

O experimento constituiu em expor os líquens a um modelo de estresse abiótico. A coleta de material foi feita no Parque Nacional das Emas, uma área de preservação permanente, do tipo Cerrado sensu stricto. Foi utilizada uma espécie de líquens dentro de duas das classificações para talo: Folioso e Fruticoso. Como líquen folioso foi utilizado a espécie *Parmotrema tinctorium* e para fruticoso *Usnea barbata*. Em laboratório, os líquens foram expostos ao cádmio através da metodologia de chuva simulada, que consisti em borrifar nos líquens diferentes concentrações de cádmio, assim, simulando a dispersão de partículas que acontece na natureza, as análises foram realizadas 24 horas após as exposições. As concentrações testadas para o metal foram: 0, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 μM , cada solução foi preparada uma em um volume total de 1000 mL. O metal foi fornecido na forma divalente (Cd^{2+}), como cloreto. O delineamento experimental consistiu em esquema fatorial duplo: 02 espécies de líquens, 07 concentrações do metal pesado. As análises foram conduzidas em triplicatas, somando 42 unidades experimentais.

Respostas Fisiológicas

Viabilidade Celular

Células do fotobionte foram marcadas utilizando o corante vermelho neutro. 100 células foram contadas por amostra em microscópio óptico e classificadas em células vivas, mortas ou plasmolisadas (Zetsche & Meysman, 2012).

Avaliação dos pigmentos fotossintéticos

A concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b, total, Carotenoides, razão entre Cla/Clb e o índice de feofitinação) foi avaliada nos talos. Nos líquens, a alta concentração de substâncias ácidas pode aumentar o índice de feofitinação da clorofila, para evitar este efeito, os talos foram previamente lavados em acetona 100% saturada com CaCO_3 . A extração dos pigmentos cloroplastídicos foi feita em solução de extração, constituída de DMSO e Polivinilpirrolidona (PVP) a 2,5 mg/ml. Os talos foram cobertos com 5 ml da solução de extração, e os frascos selados e cobertos com papel alumínio, mantidos a 65°C , no escuro, por 40 min. O espectro de absorção foi medido em espectrofotômetro para os comprimentos de onda 665 e 648 nm, com calibração contra o branco contendo apenas solução de extração. A turbidez foi verificada a 750 nm. Nos casos em que o valor foi superior a 0,01 DO, o extrato foi centrifugado (2000 g) por 90 segundos e o sobrenadante, reavaliado. A quantificação dos pigmentos foi feita com base no trabalho e na metodologia de (Lichtenthaler & Wellburn, 1983).

Parâmetros de fluorescência da clorofila a

A fluorescência transiente OJIP da clorofila a foi determinada com o uso de fluorômetro portátil FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments; Drasov, Czech Republic). O produto da energia luminosa do centro de reação fotossistema II, foi determinados com o método de saturação por pulso. Foram calculados os fluxos específicos de energia através do centro de reação e rendimentos energéticos, como transporte de elétrons por centro de reação (EToRC), fluxo específico de absorção de energia luminosa (ABS/RC), taxa de captura máxima do FSII (TRo/RC), fluxo específico de dissipação da energia ao nível das clorofilas da antena. Quanto mais alto o valor, maior o estresse. (DIo/RC), índice de desempenho fotossintético (PIABS), rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (PHiPo), rendimento quântico (PSIo) e rendimento quântico do transporte de elétrons (PHIEo) (Strasser et al., 2000).

Atividade de enzimas antioxidantes

Para as análises de quantificação da atividade de enzimas do sistema antioxidante e quantificação do peróxido de hidrogênio foi utilizado fragmentos dos talos. Todas as amostras foram devidamente coletadas, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C .

A extração das enzimas foi realizada a partir da maceração de 300 mg de tecido liquênico em nitrogênio líquido com 50% de Polivinilpirrolidona (PVP) e procedendo ao protocolo de extração proposto por Biemelt, Keetman e Albrecht (1998), em que o tampão de extração foi composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico a 10 mM. Em seguida, o extrato foi submetido à centrifugação a 13000 g por 10 minutos, a 4°C . Os sobrenadantes, posteriormente obtidos, foram utilizados para avaliar a atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).

A atividade da SOD foi determinada com base na metodologia de Giannopolitis & Ries (1977), em que é avaliada a capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). Para tanto, uma alíquota do extrato enzimático foi incubada em um meio contendo 50 mM de fosfato de potássio pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM e riboflavina 2 μM . As amostras, juntamente com o meio de incubação foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W durante 7 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. A atividade da SOD foi determinada em U mg^{-1} proteína, em que 1U corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT.

Para avaliar a atividade da CAT foi utilizada metodologia proposta por Havir & McHale (1987). Diante disso, uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), e peróxido de hidrogênio 12,5 mM. A atividade da enzima foi determinada com base no consumo de H_2O_2 a cada 15 segundos, por 3 minutos, a 240 nm em espectrofotômetro. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da CAT foi determinada em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da APX foi avaliada com base na metodologia de Nakano & Asada (1981), em que se acompanha da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, durante 3 minutos. Desse modo, uma alíquota do extrato enzimático será adicionada a um meio contendo tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio 0,1 mM. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da APX foi determinada em $\mu\text{mol AsA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Para a quantificação de H_2O_2 200 mg de tecido do talo foram macerado em nitrogênio líquido e PVPP, sendo homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 10000 g por 15 minutos, a 4°C . A concentração de H_2O_2 foi obtida por espectrofotometria de acordo com Velikova, Yordanov e Edreva (2000).

A permeabilidade de membranas foi avaliada pela taxa de liberação de eletrólitos (TLE) de discos foliares imersos em de água desionizada em copos plásticos, segundo a metodologia descrita por Vasquez-Tello et al., (1990).

Análises estatísticas

Os dados obtidos a partir de cada variável resposta foram submetidos a análise de variância para se verificar possível efeito na espécie das doses, sobre a resposta dos líquens avaliados. O programa utilizado para analisar os dados foi o SISVAR®. O programa utilizado na montagem dos gráficos foi o Sigmaplot.

Resultados e discussão

Efeito significativo das doses foi observado em *P. tinctorium* e *U. barbata* em relação as células vivas e mortas (respectivamente $F = 11.212$; $p = 0.0001$, $F = 3.19$; $p = 0.0372$, $F = 13.593$; $p = 0.0000$ e $F = 2.704$; $p = 0.0587$), e somente *P. tinctorium* sofreu efeito na média de células plasmolisadas ($F = 3.700$; $p = 0.0205$). Efeito linear foi observado para a vitalidade do fotobionte

em *P. tinctorium*, havendo menor número médio de células vivas (94,66), células mortas (3,66) e células plasmolisadas (2) nos talos expostos à concentração mais alta de cádmio avaliada. Em *U. barbata* o menor número médio de células vivas foi observado também na dose mais alta de cádmio (98,00), enquanto os maiores valores para células mortas ocorreram na sexta e sétima dose respectivamente (1,13) (Figura 1). O aumento no número viável de células mortas causada pelas doses mais altas do metal indica que este elemento é tóxico as células algais dos líquens podendo comprometer a vitalidade do organismo, já que a integridade da camada fotobionte é essencial para a interação líquênica. O cádmio é encontrado no meio ambiente através de processos naturais e antrópicos e não apresenta nenhuma função conhecida em organismos vivos, levando a toxicidade até mesmo baixas concentrações (Kovacik et al., 2019). Em organismos fotossintetizantes tais como as plantas a acumulação e toxicidade do cádmio ocorre principalmente pelas concentrações exógenas e tempos de exposição (Morina & Küpper, 2020). Entretanto líquens são organismos que não apresentam raízes e por isso são expostos aos químicos por toda a sua superfície assim, afetando primeiramente a camada do fotobionte e suas células fotossintetizantes (Gallo et al., 2014).

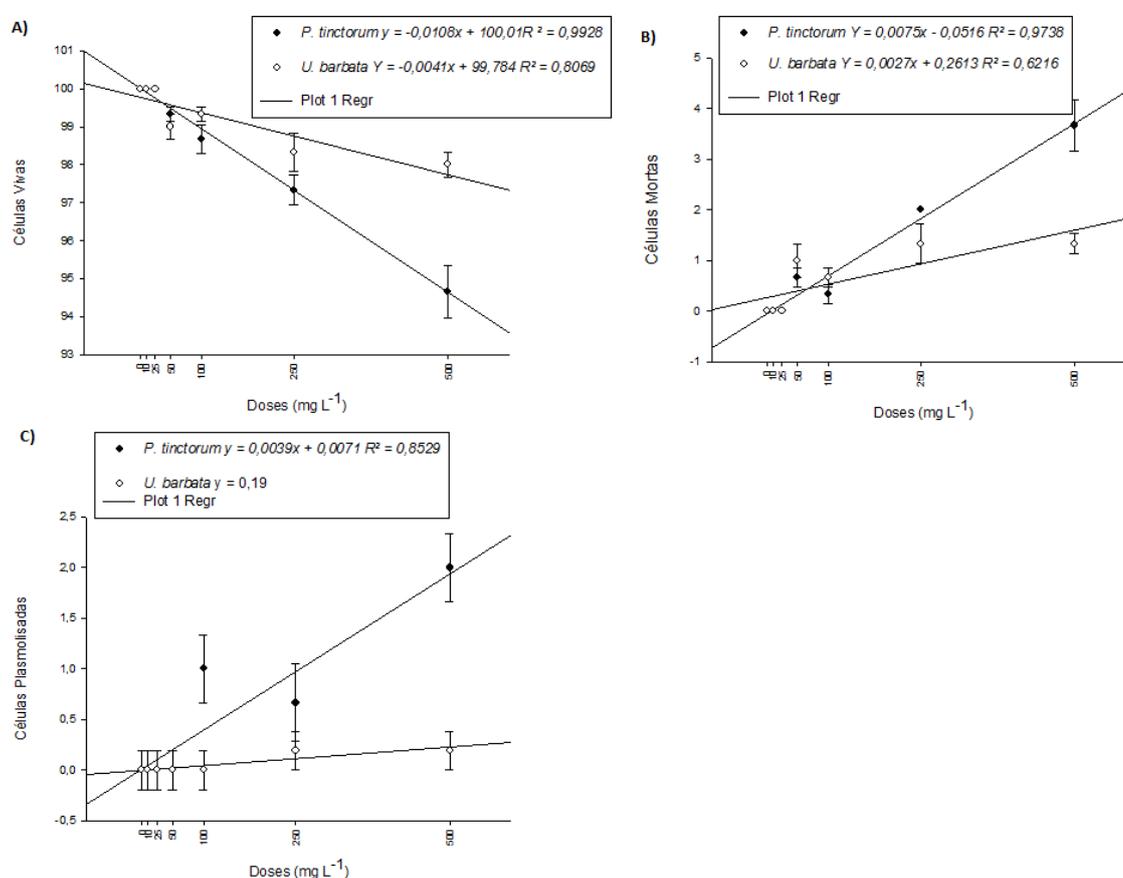


Figura 1) Número médio de células viáveis vivas (A) mortas (B) e Plasmolisadas (C) em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

Apenas *P. tinctorium* sofreu efeito das doses de Cd sobre os teores de clorofila a, b, total e carotenoides respectivamente ($F = 3.619$; $p = 0.0222$, $F = 3.605$; $p = 0.0225$, $F = 3.649$; $p = 0.0215$, $F = 3.181$; $p = 0.0349$). *P. tinctorium* e *U. barbata* sofreram efeito da dose sobre o índice de feofitinação (respectivamente $F = 28.528$; $p = 0.0000$ e $F = 2.840$; $p = 0.0504$). Em relação a clorofila a e b e total, em *P. tinctorium* não foi observado homogeneidade no efeito das doses, havendo maior concentração dos pigmentos a e b e totais na segunda dose avaliada (46,70, 106,26 e 154,33) e maior degradação destes pigmentos na sexta dose (19,18, 40,21 e 59,39). Não houve

homogeneidade no efeito das doses sobre a concentração de carotenoides em *P. tinctorium*, sendo observado a maior concentração deste pigmento na quarta dose (31,56) e maior degradação na primeira dose (8,04). Quanto ao índice de feofitinação não foi observado homogeneidade do efeito sobre a integridade das moléculas de clorofila, em *P. tinctorium* o maior índice de degradação de clorofila ocorreu na sétima dose (0,93) e o menor na quarta dose (0,79), em *U. barbata* o maior índice ocorreu na primeira dose (0,93) e o menor na quarta dose (0,80) (Figura 2). Em líquens a concentração de pigmentos fotossintéticos reflete seu estado fisiológico e é um ótimo biomarcador de estresse para esses organismos (Boonpragob.,2002). Backor et al (2010) demonstrou que o aumento das concentrações de cádmio diminui os teores de clorofila a, b e carotenoides nos líquens *Peltigera rufescens* e *Cladina arbuscula*. A baixa redução nos teores de pigmentos pode indicar que este não é um bom biomarcador para a ação deste metal pois em trabalhos com bioindicadores a coloração é um dos aspectos mais interessantes a se procurar.

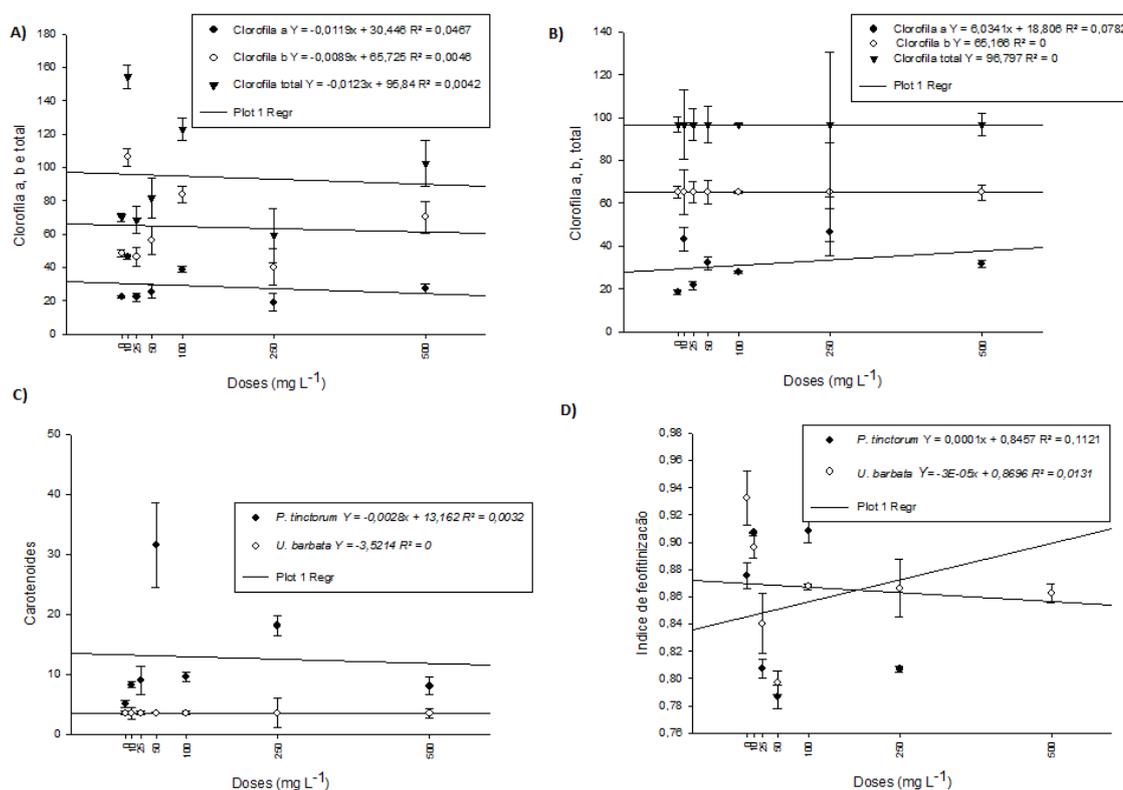


Figura 2) Teores de clorofila a, b, total em *P. tinctorium* (A), Teores de clorofila a, b, total em *U. barbata* (B), teores de carotenoides (C), índice de fertilização (D) em função em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

Para os parâmetros de fluorescência de clorofila não foi observada nenhuma alteração em todos os parâmetros avaliados em ambos os líquens testados, e pode indicar que as espécies possuem mecanismos de proteção contra a toxicidade do cádmio, ou, o tempo de exposição frente ao metal não tenha sido o suficiente para causar danos na fase fotoquímica da fotossíntese líquênica, o que pode ser sugerido pela baixa degradação de pigmentos fotossintetizantes observados em *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*. (Figura 3).

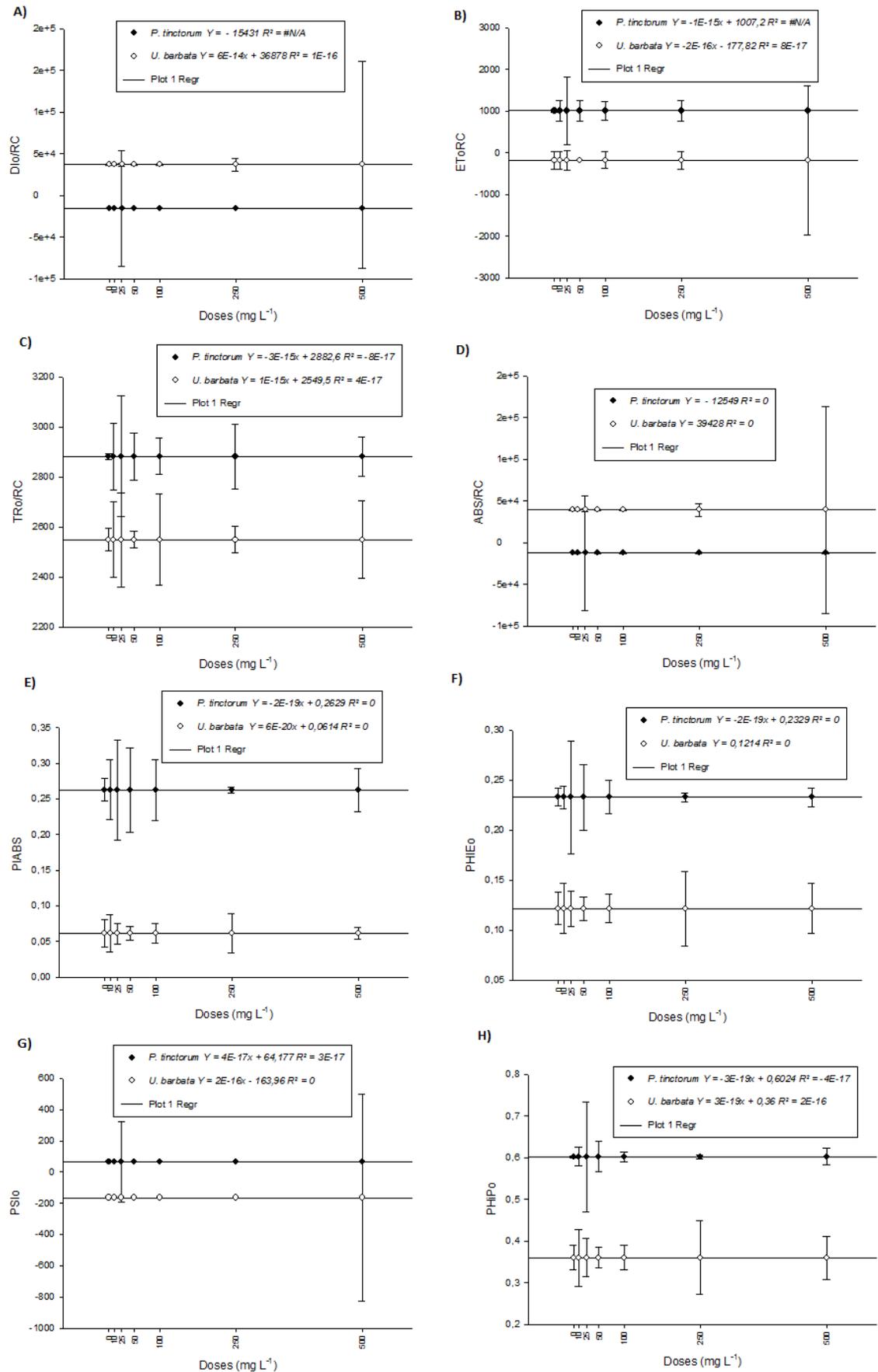


Figura 3) Valores dos Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

As enzimas SOD e APX apresentaram efeito em ambas as espécies *P. tinctorium* e *U. barbata* (respectivamente $F = 26.712$; $p = 0.0000$, $F = 91.908$; $p = 0.0001$, $F = 0.0000$; $p = 0.0003$, $F = 11.120$; $p = 0.0001$). Para a atividade da enzima CAT foi observado efeito significativo na espécie *U. barbata* ($F = 23.977$; $p = 0.0000$), Apenas *U. barbata* sofreu efeito em relação a quantificação do peróxido de hidrogênio ($F = 17.694$; $p = 0.0000$) e apenas *P. tinctorium* sofreu efeito sobre o rel ($F = 9.583$; $p = 0.0003$). Para SOD em *P. tinctorium* foi observado redução linear na atividade enzimática enquanto em *U. barbata* houve aumento linear. APX demonstrou aumento linear em ambas as espécies. CAT apresentou aumento linear em sua atividade na espécie *U. barbata* (Figura 4). Em *U. barbata* foi observado redução linear nos teores de peróxido de hidrogênio e em *P. tinctorium* foi observado aumento linear sobre a taxa de liberação de eletrólitos (Figura 5).

Exposição ao Cd induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo em plantas, podendo perturbar a estrutura e função de lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos (Gill et al., 2012). Diversos trabalhos demonstram que Cd aumenta a peroxidação lipídica na membrana em diferentes plantas (Sun et al., 2009; Mohamed et al., 2012; Tauqeer et al., 2016; Zoufan et al., 2018). A atividade de SOD em ambas as espécies está relacionada ao mecanismo de desintoxicação de Cd pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, a atividade desta enzima constitui como a primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo, tendo a importante função de converter O_2 em H_2O_2 (Castro et al., 2015; Demidchik., 2015; Zhang et al., 2017). Isto demonstra a capacidade de ambas as espécies de líquens em eliminar o excesso de ERO em condição de estresse por Cd. Esse produto deve ser removido por outras enzimas tais como, CAT, APX e GPX para evitar sua conversão em espécies mais reativas tais como $OH\cdot$, estas enzimas atuam convertendo-o em H_2O (Gill & Tuteja, 2010).

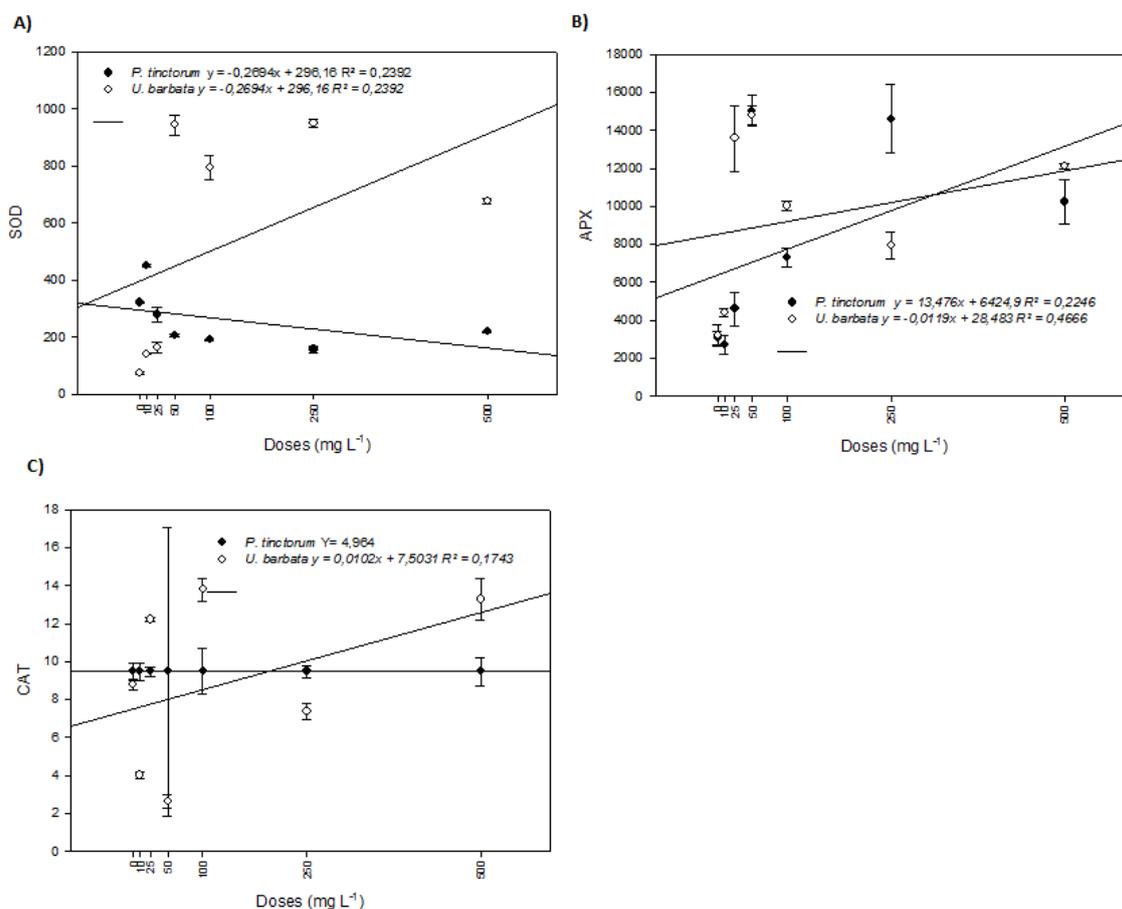


Figura 4 – Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e catalase (CAT) (C) em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

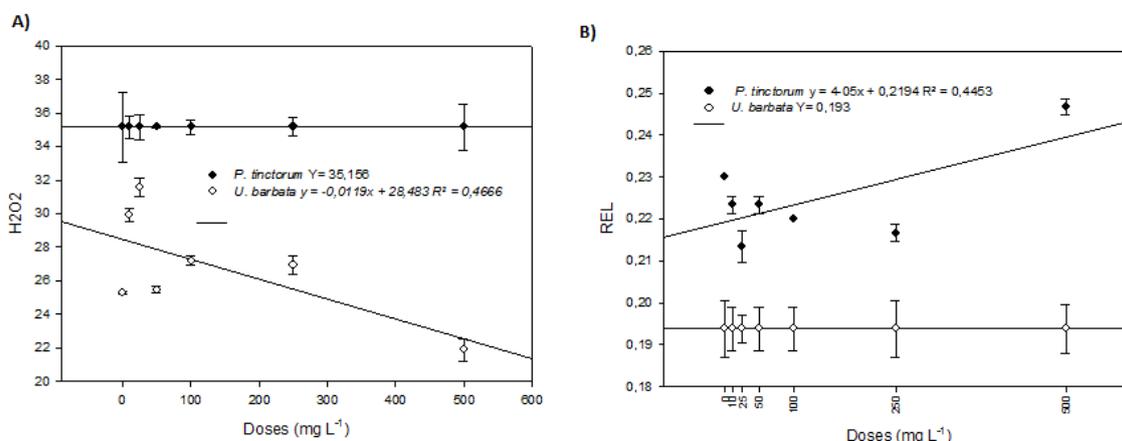


Figura 5 – Concentração de peróxido de hidrogênio H₂O₂ (A) e taxa de liberação de eletrólitos (B) em função das doses crescentes de cádmio aplicadas nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*.

Conclusão

Este estudo demonstrou que as espécies de líquens avaliadas são sensíveis ao metal pesado cádmio, já que este afeta aspectos da sua vitalidade, fisiologia e provoca defesa antioxidante, entretanto, em ambas as espécies não houve alterações em relação ao aparato fotossintético que é comumente o biomarcador mais utilizado em líquens, com isso, concluindo que ambas as espécies podem ser utilizadas como bioindicadoras da ação do cádmio em fragmentos florestais porém, a fluorescência de clorofila não é um biomarcador recomendável para avaliar para a ação do metal pesado cádmio.

Referências Bibliográficas

- Bačkor M, Kováčik J, Piovár J, Pisani T, Loppi S. (2010) Physiological aspects of cadmium and nickel toxicity in the lichens *Peltigera rufescens* and *Cladina arbuscula* subsp. *mitis*. **Water, Air, Soil Pollut.**
- Biemelt, S.; Keetman, U.; Albrecht, G. (1998) Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology.**
- Boonpragob, K. (2002). Monitoring physiological change in lichens: total chlorophyll—content and chlorophyll degradation. In P. L. Nimis, C. Scheidegger & P. A. Wolseley (Eds.), *Monitoring with lichens—monitoring lichens* (pp. 323–326). New York: Kluwer.
- Carreras, H. A., & Pignata, M. L. (2007). Effects of the heavy metals Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺ on some physiological parameters of the lichen *Usnea amblyoclada*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.**
- Castro, A. V., de Almeida, A.-A. F., Pirovani, C. P., Reis, G. S. M., Almeida, N. M., & Mangabeira, P. A. O. (2015). Morphological, biochemical, molecular and ultrastructural changes induced by Cd toxicity in seedlings of *Theobroma cacao* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety.**

Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**.

Dzubaj, A., Bačkor, M., Tomko, J., Peli, E., & Tuba, Z. (2008). Tolerance of the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. to metal stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.

Gallo, L., Corapi, A., Loppi, S., Lucadamo, L., 2014. Element concentrations in the lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf transplanted around a cement factory (S Italy). **Ecol. Indicat.** 46, 566–574.

Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**.

Gill, S. S., Khan, N. A., & Tuteja, N. (2012). Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). **Plant Science**.

Gonçalves Junior, A.C.; Pessoa, A.C.S. (2002). Fitodisponibilidade de Cádmiu, Chumbo e Crômio, em soja cultivada em argilossolo vermelho eutrófico a partir de adubos comerciais. **Scientia Agrária**.

Hassan M, Mansoor S. (2014). Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in mung bean seedlings after lead and cadmium treatments. **Turk J Agric For**.

Havir, E. A.; Mchale, N. A. (1987.) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 84, n. 2, p. 450-455.

Hawksworth, D.L., Hill, D.J., 1984. The Lichen e Forming Fungi. **Chapman and Hall, New York, USA**.

Hegedus A, Erdei S, Janda T, Toth E, Horvath G, Dubits D. (2004). Transgenic tobacco plants over producing alfafa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and Cadmium stress. **Plant Sci**.

Kovacik, J., 2019. Role of low molecular weight compounds in cadmium stress tolerance. In: Hasanuzzaman, M., Prasad, M.N.V., Nahar, K. (Eds.), *Cadmium Tolerance in Plants: Agronomic, Molecular, Signaling, and Omic Approaches*. **Academic Press**, pp. 281–318.

Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochem. Soc. Trans**.

Melo, E. E. C., Costa, E. T. S., Guilherme, L. R. G., Faquin, V., & Nascimento, C. W. A. (2009). Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials**.

Metwally, A.; Finkemeier, I.; Georgi, M., Diezt, K-J. (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. **Plant Physiology**.

Mishra, V. K., & Tripathi, B. D. (2008). Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**.

Mohamed, A. A., Castagna, A., Ranieri, A., & Sanità di Toppi, L. (2012). Cadmium tolerance in Brassica juncea roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**.

Monnet, F., Bordas, F., Deluchat, V., & Baudu, M. (2006). Toxicity of copper excess on the lichen Dermatocarpon luridum: Antioxidant enzyme activities. **Chemosphere**.

Morina, F., Küpper, H., 2020. Direct inhibition of photosynthesis by Cd dominates over inhibition caused by micronutrient deficiency in the Cd/Zn hyperaccumulator Arabidopsis halleri. **Plant Physiol. Biochem.** 155, 252–261.

Nakano, Y.; Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**.

Nava, I.A.; Gonçalves Junior, A.C.; Nacke, H.; Guerini, V.L., Schwantes, D. (2011). Disponibilidade dos metais pesados tóxicos cádmio, chumbo e cromo no solo e tecido foliar da soja adubada com diferentes fontes de NPK+ZN. **Ciênc. Agrotec.**

Palharini, K. M. Z., Vitorino, L. C., Bessa, L. A., de Carvalho Vasconcelos Filho, S., & Silva, F. G. (2021). Parmotrema tinctorium as an indicator of edge effect and air quality in forested areas bordered by intensive agriculture. **Environmental Science and Pollution Research**.

Sanità di Toppi, L., Vurro, E., Rossi, L., Marabottini, R., Musetti, R., Careri, M., Badiani, M. (2007). Different compensatory mechanisms in two metal-accumulating aquatic macrophytes exposed to acute cadmium stress in outdoor artificial lakes. **Chemosphere**.

Schützendübel, A.; Schwanz, P.; TEICHMANN, T.; Gross, K.; Langenfeld-heyser, R.; Godbold, D.L.; Polle, A. (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**.

Silva, S. A. e, Techio, V. H., de Castro, E. M., de Faria, M. R., & Palmieri, M. J. (2013). Reproductive, Cellular, and Anatomical Alterations in Pistia stratiotes L. Plants Exposed to Cadmium. **Water, Air, & Soil Pollution**.

Soltan, M.E.; Rashed, M.N. (2003). Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. **Advances in Environmental Research**.

Strasser, R.J.; Srivastava, A.; Tsimilli-Michael, M. (2000) The fluorescence transient the a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation; **Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P., Eds.; Taylor and Francis: New York, NY, USA**; pp. 445–483.

Sun, Y., Zhou, Q., Wang, L., & Liu, W. (2009). Cadmium tolerance and accumulation characteristics of Bidens pilosa L. as a potential Cd-hyperaccumulator. **Journal of Hazardous Materials**.

Tauqeer, H. M., Ali, S., Rizwan, M., Ali, Q., Saeed, R., Iftikhar, U., ... Abbasi, G. H. (2016). Phytoremediation of heavy metals by Alternanthera bettzickiana: Growth and physiological response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.

Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham Thi, A.T., Vieira Silva, J. B. (1990) Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in haseolus and Vigna species. **Journal of Experimental Botany**.

Vecchia, F.D.; LA Rocca, N.; Moro, I.; DE Faveri, S.; Andreoli, C.; Rascio, N. (2005). Morphogenetic ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. **Plant Science**.

Velikova, V.; Yordanov, I.; Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**.

Zetsche, E. M., Meysman, F. J. R. (2012) Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. **J. Plankton Res.**

Zhang, H., Lv, S., Xu, H., Hou, D., Li, Y., & Wang, F. (2017). H₂O₂ Is Involved in the Metallothionein-Mediated Rice Tolerance to Copper and Cadmium Toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**.

Zoufan, P., Jalali, R., Hassibi, P., Neisi, E., & Rastegarzadeh, S. (2018). Evaluation of antioxidant bioindicators and growth responses in *Malva parviflora* L. exposed to cadmium. **Physiology and Molecular Biology of Plants**.