

Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde

Bacharelado em Ciências Biológicas

Ação do sistema enzimático antioxidante dos líquens *Parmotrema tinctorum* e *Usnea barbata* na presença do herbicida glifosato

Damiana Souza Santos Augusto

Abril/2022

Rio Verde – GO

Damiana Souza Santos Augusto

Ação do sistema enzimático antioxidante dos líquens *Parmotrema tinctorum* e *Usnea barbata* na presença do herbicida glifosato

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, como parte das exigências da disciplina TCC-214 – Trabalho de Curso II, do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Luciana Cristina Vitorino

ABRIL/2022

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

A923a

Augusto, Damiana Souza Santos

Ação do sistema enzimático antioxidante dos
líquens Parmotrema tinctorum e Usnea barbata na
presença do herbicida glifosato / Damiana Souza
Santos Augusto; orientadora Luciana Cristina
Vitorino. -Rio Verde, 2022.

19 p.

TCC (Graduação em Bacharelado em Ciências
Biológicas) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2022.

1. líquens. 2. glifosato. 3. estresse oxidativo. 4.
herbicida. 5. tóxicos. I. Vitorino, Luciana Cristina ,
orient. II. Título.



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"/> Artigocientífico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional -
Tipo:

Nome completo do autor:

Matrícula: Damaiana Souza Santos Augusto 2016102230530376

Título do trabalho:

Ação do sistema enzimático antioxidante dos líquens Parmotrema tinctorum e Usnea barbata na presença do herbicida glifosato

RESTRICÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documentoconfidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 01 /06 /2022

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

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

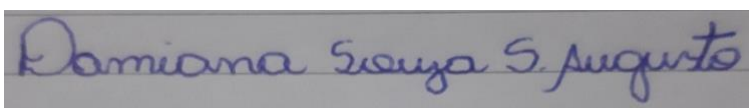
DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) 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 inclusos 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.

Rio verde-GO
Local

07 / 05 / 2022
Data



Ciente e de acordo:

Assinatura do(a)
orientador(a)

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

Ata nº 31/2022 - GGRAD-RV/DE-RV/CMPRV/IFGOIANO

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Ao(s) vinte nove dia(s) do mês de abril de 2022, às 08 horas, reuniu-se a banca examinadora composta pelos docentes: Luciana Cristina Vitorino (orientador), Mateus Neri Oliveira Reis (membro) e Alex Marcelino Dos Santos (membro), para examinar o Trabalho de Curso intitulado “Ação do sistema enzimático antioxidante dos líquens Parmotrema

tinctorum e Usnea barbata na presença do herbicida glifosato” da estudante Damiana Souza Santos Augusto, Matrícula nº 2016102230530376 do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do IF Goiano – Campus Rio Verde. A palavra foi concedida a estudante para a apresentação oral do TC, houve arguição da candidata pelos membros da banca examinadora. Após tal etapa, a banca examinadora decidiu pela APROVAÇÃO da estudante. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora.

(Assinado Eletronicamente)

Luciana Cristina Vitorino

Orientador(a)

(Assinado Eletronicamente)

Mateus Neri Oliveira Reis

Membro

(Assinado Eletronicamente)

Alex Marcelino Dos Santos

Membro

Documento assinado eletronicamente por:

- Alex Marcelino dos Santos, 2019202310840013 - Discente, em 29/04/2022 13:35:44.
- Mateus Neri Oliveira Reis, 2021202320140009 - Discente, em 29/04/2022 11:08:32.
- Luciana Cristina Vitorino, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 29/04/2022 09:05:16.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 29/04/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 383261
Código de Autenticação: bfe4c3f216



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 GERAL	7
2.2 ESPECÍFICOS.....	7
3. REFERENCIAL TEÓRICO	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
6. CONCLUSÕES.....	15
7. REFERÊNCIAS	16

Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática das vias de eliminação de EROs em cloroplastos.

Figura 2 – 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 3 – Concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em *P. tinctorum* (A) e *U. barbata* (B) em questão das 4 doses de herbicida glifosato aplicadas..

Figura 4 – Concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em *P. tinctorum* e *U. barbata* (A) em questão dos 3 períodos exposição ao herbicida glifosato.

Figura 5 – 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 6 – 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.

Resumo

Líquens são organismos muito sensíveis aos xenobióticos e podem ser utilizados como bioindicadores de poluição ambiental, contudo, são escassos os trabalhos que utilizam líquens no biomonitoramento de poluição agrícola causada por herbicidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses do herbicida glifosato em diferentes períodos de exposição sobre os líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* a fim de avaliar se o estresse oxidativo é um biomarcador promissor a ser utilizado no biomonitoramento de herbicidas por espécies liquênicas. Foi avaliada a concentração de H_2O_2 e atividade das enzimas SOD, APX e CAT. Foi observado em ambas as espécies aumento nas concentrações de H_2O_2 e aumento na atividade das enzimas SOD e APX, o que demonstra que ambas as espécies sofreram estresse oxidativo e alterações no metabolismo antioxidante. Desta forma se conclui que o estresse oxidativo é um biomarcador promissor a ser utilizado em trabalhos que avaliam os efeitos de herbicidas em espécies de líquens.

1. Introdução

Uma forma de avaliar os impactos que poluentes podem causar no meio ambiente e através da utilização de espécies indicadoras de impacto ambiental, os bioindicadores, através do biomonitoramento. Essa é uma metodologia que faz uso das reações biológicas em todos os níveis para a caracterização das mudanças nas condições ambientais (Arndt e Schweizer, 1991). No biomonitoramento se faz uso dos biomarcadores, que podem ser alterações morfológicas, anatômicas, fisiológicas ou moleculares causadas por um estresse abiótico e que podem ser associados à presença de contaminação ambiental (Pernia et al., 2008).

Líquens são organismos formados pela união simbiótica e mutualística entre um fungo e um microrganismo fotossintetizante. Devido às suas características morfológicas, anatômicas e fisiológicas são organismos extremamente sensíveis às alterações ambientais, assim sendo considerados excelentes bioindicadores de poluição atmosférica a um nível global (Käffer et al., 2012; Matos et al., 2017).

O glifosato é um herbicida pós-emergente, não seletivo e de ação sistêmica, e tem como modo de atuação a inibição da ação da enzima sintase do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSPs), o que leva ao acúmulo do ácido chiquímico nos tecidos vegetais e impede a transformação de ácido chiquímico em corismato, o resultado é o acúmulo do

ácido chiquímico que compromete a síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (Velini et al., 2009).

A problemática ambiental do uso deste herbicida se encontra em sua aplicação, em um fenômeno chamado de deriva. Deriva é o desvio de gotículas formadas durante a pulverização e que não atingem o alvo, podendo impactar a comunidade botânica no entorno das áreas agrícolas (Tuffi-Santos et al., 2011). Glifosato é fitotóxico e pode causar danos em plantas não alvo, diminuição no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, nas taxas fotossintéticas e respiratórias são alguns dos efeitos nocivos mais comuns em plantas contaminadas pelo herbicida (Ding et al., 2011).

Diversos estresses abióticos podem causar a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) como $\bullet\text{OH}$ (radical hidroxila), O_2^- (ânion superóxido) H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e $^1\text{O}_2$ oxigênio singlete (Gil e Tuteja, 2010). Para a proteção contra esses intermediários de oxigênio que são prejudiciais ao metabolismo e danosos à estrutura celular, os organismos investem energia para aumentar a produção de agentes antioxidantes, tais como as enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT); peroxidase (POX); peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutatona (GPX) e a redutase da glutatona (GR), que atuam convertendo as ROS em intermediários menos tóxicos (Gill et al., 2013).

A maioria dos estudos com líquens utilizam a vitalidade das células fotossintetizantes para determinar o impacto de um agente poluente sobre as espécies estudadas, entretanto, são poucos os trabalhos que buscam utilizar o estresse oxidativo e o sistema de defesa antioxidante enzimático como parâmetros nos estudos em espécies liquênicas. Estudos que investigam os efeitos do glifosato no metabolismo antioxidante de líquens ainda são escassos, sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito de diferentes doses deste herbicida sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata*, afim de propor um novo biomarcador para a detecção da presença deste poluente no meio ambiente em trabalhos com espécies de líquens.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar o estresse oxidativo e o mecanismo de ação do sistema antioxidante enzimático nos líquens *Parmotrema tinctorum* e *Usnea barbata* expostos a diferentes concentrações do herbicida glifosato.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificação da espécie reativa de oxigênio (ERO) peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
- Avaliação da atividade da enzima do sistema antioxidante dismutase do superóxido (SOD).
- Avaliação da atividade da enzima do sistema antioxidante catalase (CAT).
- Avaliação da atividade da enzima do sistema antioxidante peroxidase do ascorbato (APX).

3. Referencial Teórico

3.1 Líquens

Líquens são uma estável associação simbiótica e mutualística entre fungos (micobiontes) e algas e/ou cianobactérias (fotobiontes) que geram um talo. Nesta interação o fotobionte realiza síntese de matéria orgânica através da fotossíntese, produzindo carboidratos para suprir as necessidades do micobionte quanto a respiração e crescimento, já o micobionte fornece ao fotobionte proteção mecânica contra a dessecação e altas intensidades luminosas. As interações que ocorrem dentro do talo liquênico são complexas e estes organismos podem ser considerados mais como ecossistemas e comunidades do que um único organismo (Honda & Vilegas, 1999; Fahselt, 2008).

Em sua maioria a anatomia dos líquens é constituída por camadas de tecidos, sendo geralmente uma espessa camada cortical superior e inferior formada por massas de hifas fúngicas, uma fina camada de células algais sob o córtex superior e uma massa entrelaçada de hifas medulares centrais que suportam a camada algal e auxiliam durante as trocas gasosas. Contudo, ainda é possível encontrar uma grande variedade morfológica entre diferentes espécies de líquens (Lawrey, 2009).

Líquens são organismos que não possuem camadas de proteção, não utilizam raízes para absorção de nutrientes, absorvendo os nutrientes necessários que se encontram dispersos no ar, são diretamente dependentes da disponibilidade de água e luz do ambiente, e não apresentam estruturas de excreção sendo incapazes de eliminar do talo substâncias indesejáveis, são organismos perenes, com crescimento lento e com morfologia uniforme durante o desenvolvimento. Todas essas características tornam os líquens organismos extremamente sensíveis as mudanças ambientais, sendo assim considerados como ótimos bioindicadores de poluição atmosférica (Käffer et al., 2012; Paoli et al., 2012; Boch et al., 2013; McMullin et al., 2017).

3.2 Herbicida Glifosato

O herbicida glifosato é um dos mais utilizados na agricultura a nível global, sendo comercializado em mais de 130 países e utilizado no controle de diversas espécies de plantas daninha. Entre as características que o tornou um dos herbicidas mais comercializados e estudados está sua alta eficiência no controle de espécies indesejadas, pouca toxicidade para os seres humanos, e ser capaz de proporcionar um aumento significativo na produtividade de muitas culturas. É um herbicida sistemático, pós-emergente e com amplo aspecto devido a não ser seletivo (Duke & Powles, 2008).

Glifosato tem como mecanismo de ação a interferência da importante via metabólica 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPs), que catalisa a síntese de três aminoácidos aromáticos que são fundamentais para o desenvolvimento das plantas (fenilalanina, triptofano e tirosina), desta forma impedindo a síntese metabólicos secundários (compostos fenólicos e nitrogenados) que são utilizados nos processos defensivos, reprodutivos e de crescimento vegetal (Velini et al., 2008; Olesen & Cedergreen, 2010; Zobiolo et al., 2011).

Em áreas de atividade agrícola o glifosato geralmente é pulverizado diretamente nas plantas alvos, contudo, uma porção pode atingir a vegetação adjacente através de dispersão de partículas em um processo chamado de deriva, que pode acarretar na exposição e contaminação em espécies não alvo (Flores et al., 2017; Dupont et al., 2018; Lucadamo et al., 2018; Rezende-Silva et al., 2019).

3.3 Estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas que apresentam elétrons desemparelhados e são altamente reativas, podendo causar danos ao metabolismo celular, tais como; peroxidação lipídica, danos ao material genético, oxidação protéica e inibição enzimática. Devido aos diversos danos celulares que podem causar os altos níveis de ROS em plantas precisam ser regulados por um complexo sistema de defesa antioxidante, que pode ser enzimático e não enzimático (Verma & Dubey, 2003; Meriga et al., 2004; Mishra et al., 2011). Entre os principais tipos de ROS estão o oxigênio singlete (1O_2), superóxido radical ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Mittler, 2017; Soares et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2020).

A geração de EROS tóxicos como um subproduto ocorre em vários sítios celulares, como mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos, e apoplasto (Xie et al., 2019). O sistema de defesa antioxidativo enzimático é composto por várias enzimas, sendo as principais a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX), a redutase da glutatona (GR), a peroxidase da glutatona (GPX) e a sulfotransferase da glutatona (GST). Estas enzimas agem em diferentes compartimentos subcelulares, mas atuam de forma conjunta para atenuar os danos celulares em células sob estresse oxidativo (Sharma et al., 2012).

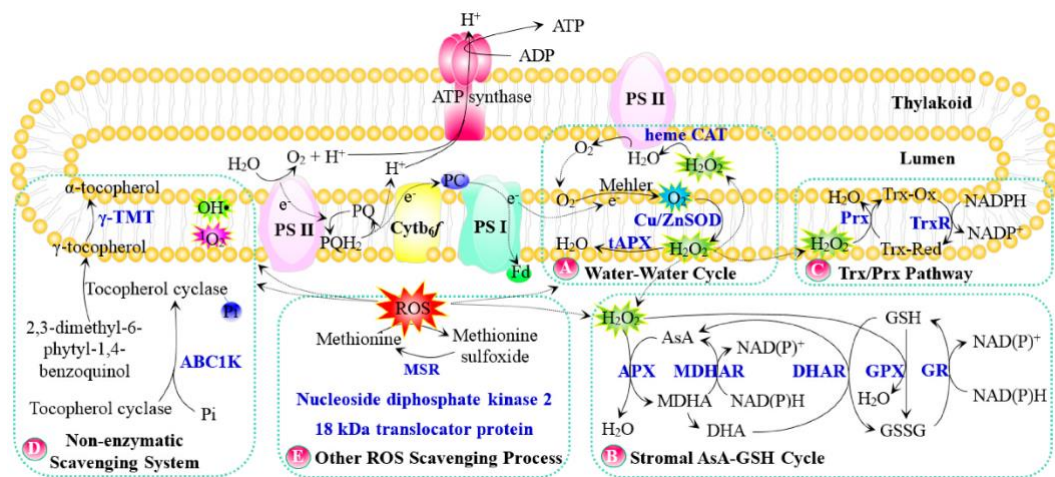


Figura 1. Representação esquemática das vias de eliminação de EROs em cloroplastos. Fonte: Suo et al. (2017).

4. Material e métodos

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*.



Figura 2. Líquens *Parmotrema tinctorium* (Nyl.) Hale (A) e *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg (B) coletados em área de preservação permanente, do tipo Cerrado sensu stricto.

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, 4,8 mg L⁻¹, 9,6 mg L⁻¹ (a recomendada pelo fabricante do produto), 19,2 mg L⁻¹ e controle (com água destilada 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.

Para as análises de avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante e quantificação do peróxido de hidrogênio, serão utilizados fragmentos dos talos. Todas as

amostras estão devidamente coletadas, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a -80°C .

A extração das enzimas será 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 é 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 será submetido à centrifugação a 13000 g por 10 minutos, a 4°C . Os sobrenadantes, posteriormente obtidos, serão utilizados para avaliar a atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).

A atividade da SOD será 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 será 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, serão iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W durante 7 minutos. As leituras serão realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. A atividade da SOD será 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 será utilizada metodologia proposta por Havir & McHale (1987). Diante disso, uma alíquota do extrato enzimático será 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 será 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 será $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da CAT será determinada em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da APX será 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 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 será $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da APX será 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 serão 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 H₂O₂ será obtida por espectrofotometria de acordo com Velikova, Yordanov e Edreva (2000).

5. Resultados e Discussão

Na espécie *P. tinctorum* 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 na concentração de peróxido de hidrogênio ($F = 0.000$; $p = 0.0000$). 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 na concentração de peróxido de hidrogênio ($F = 0.000$; $p = 0.0000$ e $F = 6718.808$; $p = 0.0000$).

De modo geral o herbicida glifosato promoveu alterações no metabolismo dos líquens *P. tinctorum* e *U. barbata* com toxicidade evidenciada pela aumento na concentração H₂O₂ e na atividade de enzimas do sistema antioxidante. Em *P. tinctorum* e foi observado um aumento linear nos níveis de peróxido de hidrogênio em relação as doses aplicadas e aos tempos de exposição, enquanto para *U. barbata* foi observado redução linear nos níveis de peróxido de hidrogênio quanto as doses aplicadas e aos tempos de exposição, o que é um indicativo que ambas as espécies sofreram estresse oxidativo (Fig 1 e 2). A produção de EROS pode ser provocada pela estresse causado por diversos xenobióticos, inclusive herbicidas como o glifosato (Gomes et al., 2014; Gomes & Juneau., 2016; Freitas-Silva et al., 2017).

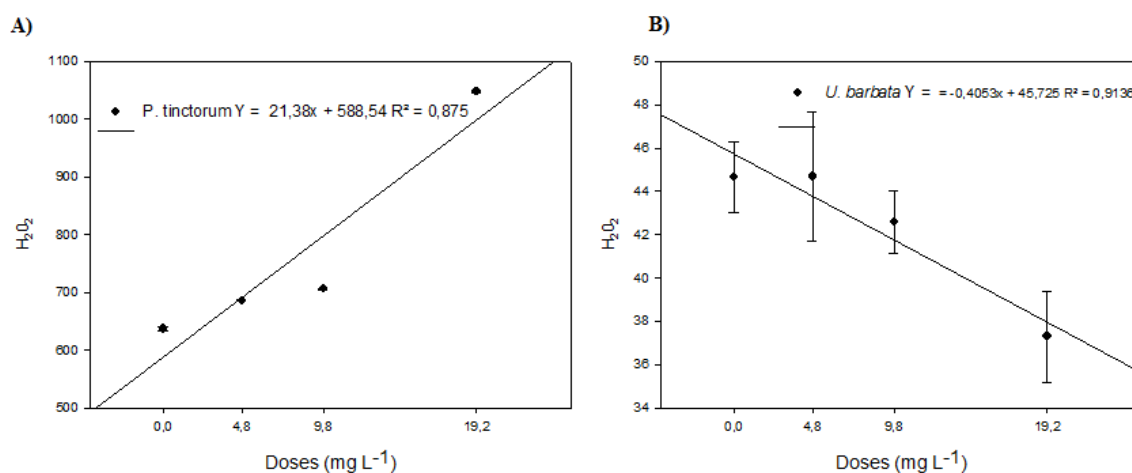


Figura 3. Concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em *P. tinctorum* (A) e *U. barbata* (B) em questão das 4 doses de herbicida glifosato aplicadas.

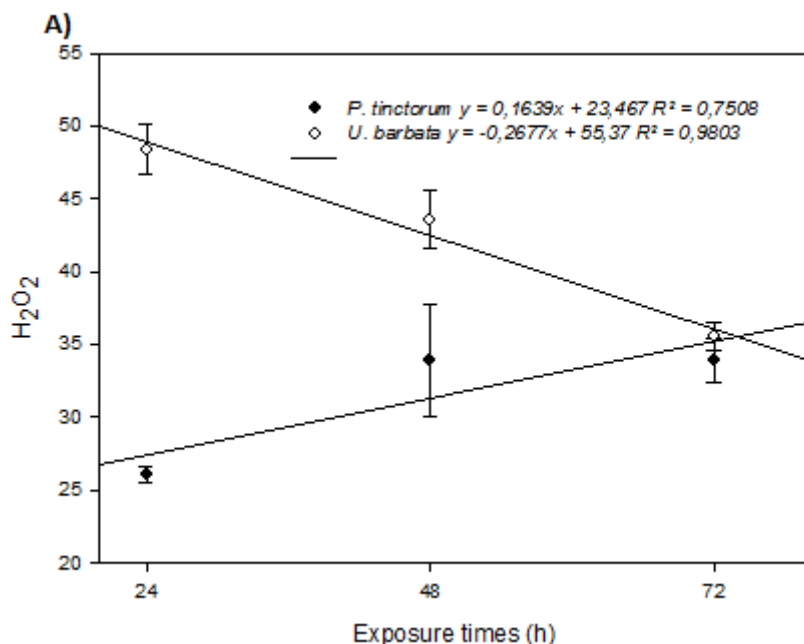


Figura 4. Concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em *P. tinctorum* e *U. barbata* (A) em questão dos 3 períodos exposição ao herbicida glifosato.

Também foi observado em *P. tinctorum* e *U. barbata* um aumento linear na atividade da enzima SOD em relação as doses e tempos (Fig 3,4,A), o aumento da atividade desta enzima neste estudo está provavelmente relacionado ao mecanismo de defesa celular contra o aumento de superóxidos (O₂⁻) causado pela toxicidade do herbicida glifosato, a SOD atua na dismutação de superóxido em H₂O₂, este subproduto em baixas concentrações atua como um importante sinalizador celular secundário, mas ainda é um produto nocivo ao metabolismo celular em altas concentrações (Gupta et al., 2016), no entanto, a completa desintoxicação celular depende ainda da ação complementar de enzimas como APX e CAT que atuam na degradação do H₂O₂. Foi observado em ambas as espécies aumento linear na atividade de APX tanto em relação as doses e tempos (Fig 3,4,B), com o aumento nas concentrações H₂O₂ enzimas do ciclo ascorbato glutathiona são as primeiras a agir, com APX atuando na redução do H₂O₂ em água e oxigênio. Neste trabalho foi observado um aumento linear na atividade de CAT em *P. tinctorum* em relação as doses e redução linear na atividade nas duas espécies em relação ao tempo (Fig 4,C), CAT é uma enzima que atua na desintoxicação das altas concentrações de H₂O₂, A redução na atividade desta enzimas em ambas as espécies em relação ao tempo de

exposição pode estar relacionada aos processos moleculares de regulação pós transcricional e pós traducional onde a enzima pode ter tido sua síntese reduzida ou estrutura funcional comprometida deixando de ser uma enzima (Délye et al., 2015; Liu et al., 2019; Spormann et al., 2019).

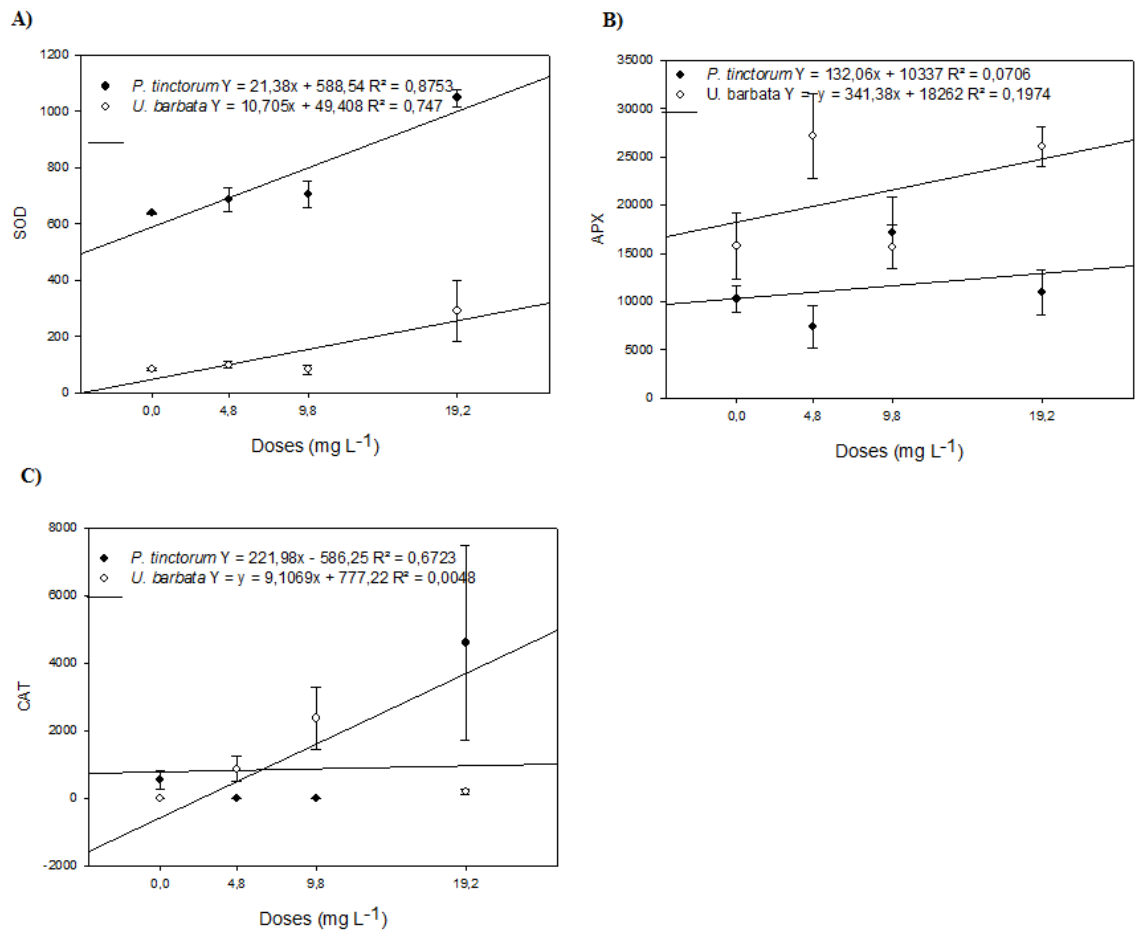


Figura 5. Atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante dismutase do superóxido (SOD) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e catalase (CAT) (C) observados nos líquens *Parmotrema tinctorium* e *Usnea barbata* tratadas com doses crescentes do herbicida glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

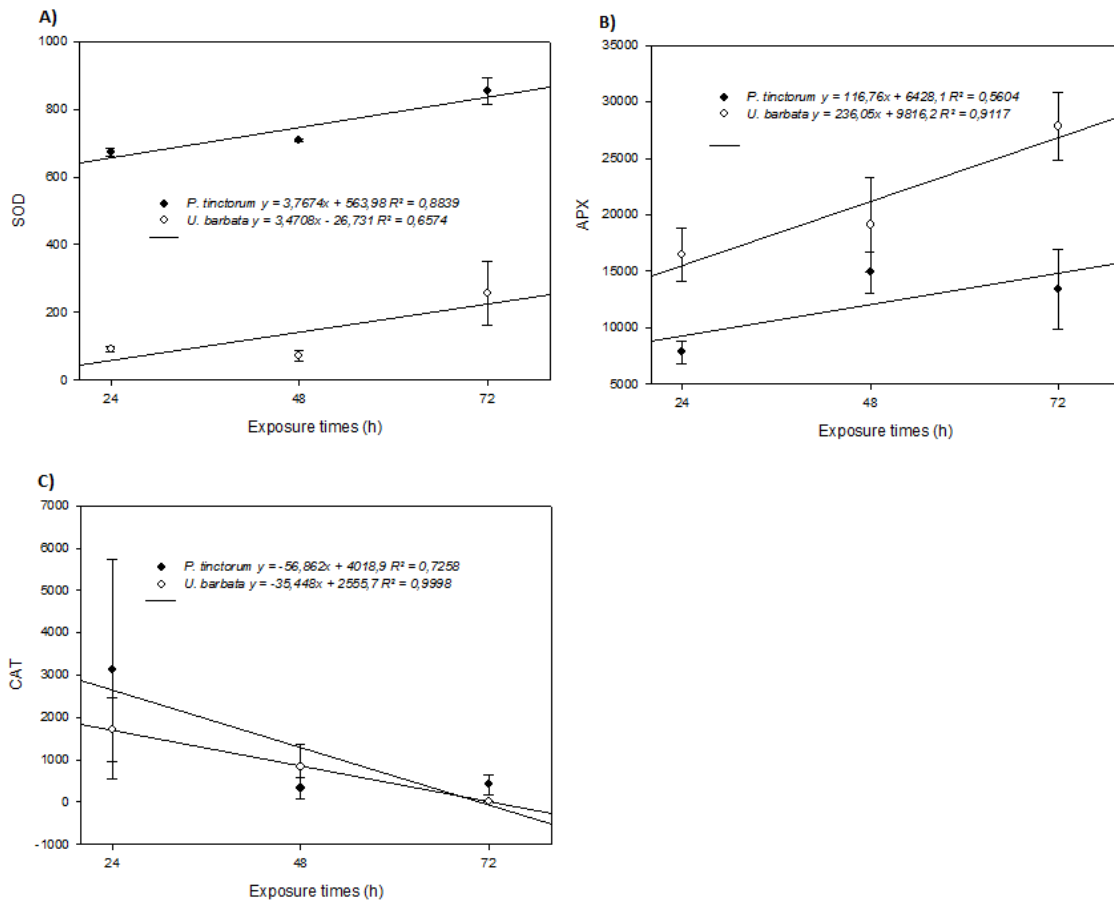


Figura 6. Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B) e catalase (CAT) (C) observados nos líquens *Parmotrema tinctorum* e *Usnea barbata* tratados com diferentes doses de glifosato e avaliados em três diferentes tempos.

6. Conclusões

1. O herbicida glifosato promove alterações no metabolismo antioxidante dos líquens *P. tinctorum* e *U. barbata*, causando aumento nas concentrações de H_2O_2 e alterações na atividade de enzimas do sistema antioxidante.
2. O herbicida glifosato induziu resposta metabólicas semelhantes nos *P. tinctorum* e *U. barbata*.
3. Todas as enzimas testadas se mostraram sensíveis a aplicação do herbicida, porém SOD e APX aparentam ser mais eficientes para atuarem como biomarcadores da sensibilidade de espécies liquênicas a exposição por glifosato junto aos concentrações de H_2O_2 .

7. Referências

ARNDT, U.; SCHLESINGER, B. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Biological monitoring – signals from the environment (Ellenberg, H. *et al.*, eds). **Viewg Eschbotin**, p. 199-259, 1991.

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**, 1998.

BOCH, S. *et al.* Richness of lichen species, especially of threatened ones, is promoted by management methods furthering stand continuity. **PLoS One**, v.8, n.1, p.1-9, 2013.

DÉLYE, C.; DUHOUX, A.; PERNIN, F.; RIGGINS, C.W.; TRANEL, P.J. Molecular mechanisms of herbicide resistance. **Weed Sci.**, 63, 91–115. 2015.

Ding W, Reddy KN, Zablotowicz RM, Bellaloui N, Bruns HA. Physiological responses of Glyphosate -resistant and Glyphosate sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of Glyphosate. **Chemosphere** 83:593-598. 2011.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest management science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

DUPONT, Y.L., STRANDBERG, B., DAMGAARD, C.. Effects of herbicide and nitrogen fertilizer on non-target plant reproduction and indirect effects on pollination in *Tanacetum vulgare* (Asteraceae). *Agric. Ecosyst. Environ.* 262, 76–82. 2018.

FAHSEL, D. 2008. Individuals and population of lichens. Pp. 252-273. In: T.H. Nash III (Ed.). **Lichen biology**. Cambridge: Cambridge University Press.

FLORENCIA, F.M., TORRES, C., BRACAMONTE, E., GALETTO, L., Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 144, 360–368. 2017.

FREITAS-SILVA, L., RODRÍGUEZ-RUIZ, M., HOUMANI, H., SILVA, L.C., PALMA, J.M., CORPAS, J.F., Glyphosate-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* triggers the activity of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway involved in the NADPH generation. **J. Plant Physiol.** 218, 196. 2017.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 1977.

GILL SS, ANJUN NA, HASANUZZAMAN M, GILL R, TRIVEDI DK, AHMAD I, PEREIRA E, TUTEJA N .Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiology and Biochemistry** 70- 204:212, 2013.

GILL SS, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 48(12):909-930. 2010.

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

GOMES, M. P., SMEDBOL, E., CHALIFOUR, A., HÉNAULT-ETHIER, L., LABRECQUE, M., LEPAGE, L., JUNEAU, P. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**. 2014.

GUPTA, K., SENGUPTA, A., CHAKRABORTY, M., & Gupta, B. Hydrogen Peroxide and Polyamines Act as Double Edged Swords in Plant Abiotic Stress Responses. **Frontiers in Plant Science**. 2016.

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Parvin, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., Fujita, M. Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(22), 8695. 2020.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 1987.

HONDA, N. K; VILEGAS, W. A química dos liquens. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 22, n. 1, p. 110-125, Feb. 1999.

KÄFFER, M. I. *et al.* Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. **Environmental pollution**, v.163, p. 24-31, 2012.

KÄFFER, M. I., LEMOS, A. T., APEL, M. A., ROCHA, J. V., MARTINS, S. M. de A., & VARGAS, V. M. F. (2012). Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. **Environmental Pollution**, 163, 24–31.

LAWREY, J.D. 2009. Lichen chemical defense. Pp. 167-181. *In*: White, J.; Torre, M.

LIU, N.; ZHONG, G.; ZHOU, J.; LIU, Y.; PANG, Y.; CAI, H.; Wu, Z. Separate and combined effects of glyphosate and copper on growth and antioxidative enzymes in *Salvinia natans* (L.) All. **Sci. Total Environ.** 655, 1448–1456. 2019.

LUCADAMO, L., CORAPI, A., GALLO, L.,. Evaluation of glyphosate drift and anthropogenic atmospheric trace elements contamination by means of lichen transplants in a southern Italian agricultural district. **Air Qual. Atmos. Health** 11 (3), 325–339. 2018.

MATOS, P.; GEISER, L.; HARDMAN, A.; GLAVICH, D.; PINHO, P.; NUNES, A.; SOARES, A.M.V.M.; BRANQUINHO, C. Tracking global change using lichen diversity: Towards a global-scale ecological indicator. **Methods Ecol. Evol.** 2017, 8, 788–798.

MCMULLIN, R. T., URE, D., SMITH, M., CLAPP, H., & WIERSMA, Y. F. Ten years of monitoring air quality and ecological integrity using field-identifiable lichens at

Kejimikujik National Park and National Historic Site in Nova Scotia, Canada. **Ecological Indicators**. 2017.

MERIGA B, REDDY BK, RAO KR, REDDY LA, KISHOR PB. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **J Plant Physiol** **161**: 63-68, 2004.

MISHRA S, Jha AB, DUBEY RS (2011) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. **Protoplasma** **248**: 565-577, 2011.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends Plant Sci.** **2017**, 22, 11–19.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, 1981.

OLESEN, C. F.; CEDERGREEN, N. Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence. **Pesticide Management Science**, v. 66 p. 536–542, 2010.

PAOLI, L. *et al.* Long-term biological monitoring of environmental quality around a solidwaste landfill assessed with lichens. **Environmental pollution**, v.161, p.70-75, 2012.

PERNÍA, B.; A. D. SOUSA, R. REYER, M. CASTRILLO, Biomarcadores de contaminação por cádmio en las plantas, **Interciência** v. 33 (2008).

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**, 102, 497–506 2019.

SHARMA P, JHA AB, DUBEY RS, PESSARAKLI M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **J Bot**, 26 pages, 2012.

SOARES, C.; CARVALHO, M.E.; AZEVEDO, R.A.; FIDALGO, F. Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. **Environ. Exp. Bot.** **2019**, 161, 4–25.

SPORMANN, S.; SOARES, C.; FIDALGO, F. Salicylic acid alleviates glyphosate-induced oxidative stress in *Hordeum vulgare* L. **J. Environ. Manag.**, 241, 226–234. 2019.

SUO, J. *et al.* Salinity response in chloroplasts: insights from gene characterization. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 5, p. E1011, May 2017.

TUFFI-SANTOS LD, GRAÇA RN, ALFENAS AC, FERREIRA FA, MELO CAD, MACHADO MS (2011) Glyphosate reduces urediniospore development and *Puccinia* disease severity on *Eucalyptus grandis*. **Pest Management Science** **67**:876-880.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, 2000.

Velini, E.; D., D. K. MESCHEDE, C. A. CARBONARI, M. L. B. Trindade, Glyphosate. Botucatu: **Fundação de Estudo e Pesquisa Agrícolas e Florestais**, (2009) pp. 496.

VELINI, E.D.; ALVES,E.; GODOY, M.C.; MESCHEDE,D. K.; SOUZA, R. T.; DUKE, S.O. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pesticide Management Science**, v. 64, p.489-496, 2008.

VERMA S, DUBEY RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Sci** **164**: 645-655, 2003.

XIE, X.; HE, Z.; CHEN, N.; TANG, Z.; WANG, Q.; CAI, Y. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. **Biomed Res. Int.** **2019**, 11, 9732325.

ZOBIOLE L. H.S. ; KREMER, R. J.; OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J. Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.99, p.53-60, 2011.