

Camila de Oliveira Viana

Monitoramento da Ação de Nanotubos de Carbono sobre Fungos
Liqueinizados Epifíticos

Belo Horizonte
2015

Camila de Oliveira Viana

Monitoramento da Ação de Nanotubos de Carbono sobre Fungos
Liqueinizados Epifíticos

*Tese apresentada no Programa de Pós-graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Microbiologia.*

Orientador: Prof. Ary Corrêa Junior

Co-orientadores:

Dra. Adelina Pinheiro dos Santos

Dr. Luiz Orlando Ladeira

Belo Horizonte
2015

“Porque a ciência não é somente a procura pela verdade, não é somente um jogo desafiador, ou uma profissão. Ela é uma vida levada por diversas pessoas, coletivamente, como uma escola onde se aprende a viver em sociedade, da forma mais coletiva possível, onde somos membros uns dos outros” (Sandy Ogston)

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, amigo, companheiro...ao meu Amor, por tudo!

Aos meus pais e irmãs pelo suporte, incentivo e compreensão.

Aos meus sogros pela amizade, confiança e torcida.

Ao meu orientador, Ary, por ter acreditado na proposta, pelos ensinamentos, discussões enriquecedoras e paciência.

Ao Prof. Luiz e à Adelina, meus co-orientadores, pelo apoio, incentivo e entusiasmo constantes.

Ao Prof. Mauro Tretiach, meu orientador durante o estágio no exterior, pela oportunidade, acolhida, e ensinamentos indispensáveis para a melhoria deste trabalho e de minha formação acadêmica...*grazie mille!*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado-sanduíche (PDSE nº 8822-11-5).

Ao CNPq e Fapemig pelo apoio financeiro.

Ao liquenólogo Marcelo Marcelli pelos ensinamentos sobre taxonomia de líquens e enorme receptividade. Também às liquenólogas Suzana Martins e Márcia Kaffer pelo importante apoio e disponibilidade.

À todos os membros do Laboratório de Liquenologia da Universidade de Trieste, em especial, à Fabio Candotto-Carniel, Stefano Bertuzzi, Danijela Kodnik e Alice Montagner pela agradável convivência e por terem compartilhado comigo alguns de seus conhecimentos em liquenologia.

Ao Laboratório de Espectroscopia Raman do Departamento de Física, pela execução das análises. Também ao senhor João e ao Tiago da Oficina Mecânica da Física pela cuidadosa construção da unidade de suspensão de nanotubos.

Ao Laboratório de Fisiologia do Departamento de Botânica pelo apoio durante as análises fisiológicas e empréstimo de equipamentos essenciais.

Aos colegas, Lara Ambrosio e Bruno Pinheiro, pelo auxílio e agradável companhia durante a coleta dos líquens.

À todos os colegas do Laboratório de Mecanismos Gerais de Infecções Fúngicas, incluindo os que passaram por aqui desde 2010, pela enorme ajuda em análises, discussões e alegre convivência!

Em suma, meu “Muito Obrigada!” à todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho que só pôde ser construído com o apoio de vocês!

SUMÁRIO

Lista de tabelas	VII
Lista de figuras	VIII
Resumo	XI
Abstract.....	XII
1. Introdução.....	13
Líquens e biomonitoramento	15
2. Justificativa.....	18
3. Objetivos	21
4. Materiais e Métodos	22
4.1 Nanotubos de carbono	22
4.2 Parmotrema tinctorum (Nyl.) Hale	24
4.3 Câmaras de topo aberto - CTAs	28
4.4 Exposição dos líquens	30
4.5 Exposição do fotobionte isolado – Trebouxia sp.....	34
4.6 Análises Estatísticas	36
5. Resultados e Discussão.....	37
5.1 Caracterização dos nanotubos de carbono.....	37
5.2 Calibração das câmaras de topo aberto.....	42
5.3 Parmotrema tinctorum	45
5.4 Exposição do líquen, Parmotrema tinctorum, aos nanotubos de carbono	46
5.4.1 Estudos preliminares - vitalidade.....	46
5.4.2 Bioacumulação/Internalização.....	47
5.4.3 Fotossíntese	49
5.4.4 Dano de membrana	50
5.4.5 Análise elementar	52
5.5 Exposição do fotobionte isolado, Trebouxia sp, aos nanotubos de carbono	55
5.5.1 Crescimento da cultura e quantificação da clorofila	55
5.5.2 Eficiência da fotossíntese.....	56
5.5.3 Dano de membrana	57
5.5.4 Biaculumação em Trebouxia	59

6. Conclusões.....	62
7. Referências bibliográficas	63
8. Anexos.....	71
Anexo 1 – Ficha de caracterização das amostras em campo.....	71
Anexo 2 – Autorização para coleta.....	72
Anexo 3 - Ficha de caracterização completa	73
Anexo 4 - Projeto de pesquisa submetido à Fundação Boticário de Conservação.....	74
9. Publicações	80
Resumos publicados em anais de congressos.....	80
Apresentações de Trabalho.....	84
Cursos de Aprofundamento	84
Manuscrito a ser submetido (em correção com co-autores)	85
Manuscrito submetido para a Ecotoxicology and Environmental Safety (em correção para re-submissão).....	92

Lista de tabelas

Tabela 1 -Resultado da pesquisa sobre biomonitoramento de nanopartículas em bases de dados de literatura científica.....	19
Tabela 2 - Distribuição de elementos químicos em <i>Parmotrema tinctorum</i> após tratamentos com MWCNT-COOH, expresso como valores médios (em mg/mL peso seco).....	52

Lista de figuras

Figura 1 – Em A, nanotubo de carbono de parede única (SWCNT), e, em B, nanotubo de carbono com múltiplas paredes (MWCNT)	13
Figura 2 – Tendências em pesquisa e comercialização de NTC. (A) publicações do periódico e patentes mundiais emitidas por ano, juntamente com a capacidade de produção anual estimada. (B a E) NTC produtos relacionados selecionados: quadro composto bicicleta [Foto de cortesia da BMC Switzerland AG], revestimentos anti-incrustantes [Nanocyl], eletrônica impressa [NEC Corporation]; e blindagem descarga eletrostática [Nanocomp Technologies Incorporated]. FONTE: De Volder et al., 2013	14
Figura 3 – Amostra de <i>Parmotrema tinctorum</i> (Nyl.) Hale	25
Figura 4 - Preparação para a exposição das amostras de <i>P. tinctorum</i> . À esquerda, os fragmentos do talo prontos para serem expostos, e à direita, etapa de condicionamento das amostras.....	26
Figura 5 - Esquema ilustrativo da câmara de topo aberto e sistemas (Adaptado de Andre, 2007).....	28
Figura 6 - Experimento preliminar utilizando o mapa feito a partir de foto da amostra para repetição da aplicação de NTCs na borda do líquen	30
Figura 7 – Distribuição das amostras de líquens dentro da câmara de topo aberto, à esquerda, e as dispersões de MWCNT-COOH em água utilizadas para a exposição, à direita	31
Figura 8 – Câmaras de Topo Aberto durante exposição dos líquens ao aerossol seco de MWCNT.....	32
Figura 9 – (A) Análise de termogravimetria da amostra de MWCNT, e (B) da amostra funcionalizada MWCNT-COOH. Em preto a curva TG e em azul sua derivada DTG.	37
Figura 10 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão das amostras dos dois tipos de nanotubos de carbono não funcionalizados: MWCNT (A a C) e MWCNT_IT (D a F). A e D: visão geral das amostras. B e E: detalhe da visão geral em maior aumento salientando nanotubos em pequenos aglomerados. Note o menor tamanho nos NTC na imagem E. C e F: detalhe de nanotubos individualizados.....	38
Figura 11 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão da amostra de MWCNT, não funcionalizado. À esquerda, o detalhe de um tubo mostrando as diversas paredes, e à direita, com as setas vermelhas destaca-se a diversidade de diâmetros dos tubos	39

Figura 12 – Fotomicrografia eletrônica de varredura das amostras de nanotubos de carbono funcionalizados. Em A nanotubos do tipo MWCNT-COOH, e em B amostra MWCNT-NH ³⁺ composta de nanotubos mais curtos e disformes, em comparação com A	39
Figura 13 - Espectro Raman da amostra MWCNT não funcionalizada e funcionalizada MWCNT-COOH com presença das bandas D, G e G', e destaque para as diferenças da razão ID/IG das amostras	40
Figura 14 - Histograma ilustrando a abrangência de valores ID/IG obtidos para as amostras de nanotubos e a distribuição dos valores para cada amostra: não funcionalizada (001 - pristine) e funcionalizada (002 e 003 - func)	41
Figura 15 - Experimentos para calibração da CTA. À esquerda, teste de alcance e distribuição com fumaça branca; à direita (acima) demonstração do magnetismo da amostra de MWCNT; à direita (abaixo) experimento de deposição para teste das armadilhas com ímãs	42
Figura 16 - Imagens MEV das fitas autocolantes de microscopia colocadas no interior da CTA para monitorar a exposição. As imagens da direita referem-se à um dia de exposição e as da esquerda à sete dias de exposição; as duas primeiras imagens (de cima para baixo), referem-se ao Tratamento 1, em seguida, o Tratamento 2 e 3.....	44
Figura 17 - Efeitos do tratamento com MWCNT-COOH (concentração entre 0,001 e 100µg/mL) no índice de vitalidade do fotobionte (IFV). (média ± desvio padrão, *estatisticamente diferente do controle)	46
Figura 18 - Espectros Raman, à esquerda, e imagem de Microscopia Confocal Raman, à direita, demonstrando a localização de obtenção dos picos característicos dos MWCNT na célula da alga. À direita, a imagem da célula da alga e os quatro pontos onde foram obtidos os espectros mostrados à esquerda.	47
Figura 19 - Fotomicrografia MEV de nanotubos de carbono (setas em vermelho) na superfície do líquen. Em (A) superfície do talo após a exposição à MWCNT com o aerossol seco, (B) MWCNT-COOH disperso em água, em (C) detalhe da célula do fotobionte raspado do córtex do líquen e em (D) detalhe (área do quadrado da imagem C) do nanotubo de carbono observado da superfície na célula. As setas apontam para os nanotubos de carbono	48

Figura 20 - Efeitos da exposição à nanotubos de carbono na eficiência fotossintética de <i>Parmotrema tinctorum</i> (média \pm desvio padrão, n=6). Em (A) resultados do tratamento à MWCNT e em (B) à MWCNT-COOH	50
Figura 21 - Efeitos da exposição à nanotubos de carbono na permeabilidade da membrana de <i>Parmotrema tinctorum</i> , expresso como condutividade elétrica média \pm desvio padrão, n=6). Em (A) após a exposição à MWCNT e em (B) à MWCNT-COOH (*, estatisticamente diferente do controle).....	51
Figura 22 - Diferenças no crescimento da cultura de <i>Trebouxia</i> sp após exposição à 100 μ g/mL de MWCNT-NH ⁺³ ; à esquerda placa na primeira semana e à direita na segunda semana após inoculação. Discos A e B: células re-suspendidas na dispersão de nanotubos antes da inoculação (A, disco de sílica, e B, de acetato). Discos C e D: células inoculadas nos discos contendo nanotubos na superfície (sendo C, disco de sílica e D de acetato). E: cultura controle no disco de acetato	55
Figura 23 - Efeito da exposição à nanotubos de carbono na quantidade de clorofila de <i>Trebouxia</i> sp para ambos tipos de exposição (MWCNT-NH ⁺³ re-suspendidos e depositados) e faixa de concentração (*, estatisticamente diferente do controle; ** estatisticamente diferente com similares do outro tratamento)	56
Figura 24 - Efeitos da exposição à nanotubos de carbono na eficiência fotossintética de <i>Trebouxia</i> sp para ambos tipos de exposição (MWCNT-NH ⁺³ re-suspendidos e depositados) e faixa de concentração	57
Figura 25 - Microfotografia confocal de células <i>Trebouxia</i> coradas com Sytox Green e observadas após 21 dias de tratamento com 0,01 μ g/mL (A, D), 1 μ g/mL (B, E), 100 μ g/mL (C, F) de MWCNT-NH ⁺³ e controle (G). Setas brancas, autósporos, e setas amarelas, célula mãe com autósporos.....	58
Figura 26 - Células de <i>Trebouxia</i> sp expostas por 24h a 100 μ g/mL de MWCNT-FITC. À esquerda, célula mãe do controle tratado com água e à direita células tratadas com MWCNT. A cor vermelha indica a emissão da clorofila a e o verde da amostra de nanotubos de carbono	59
Figura 27 - Células de <i>Trebouxia</i> sp, em diversos estágios de desenvolvimento, tratadas com 0,01 μ g/mL de MWCNT-FITC por 1h. Cor vermelha indica a emissão da clorofila a e a verde da amostra de nanotubos de carbono fluorescentes	60

Resumo

O desenvolvimento de nanoprodutos e da nanotecnologia, apesar dos avanços atuais, ainda padecem da falta de regulamentação para o uso, monitoramento e parâmetros de segurança ambiental. A falta de bioindicadores ambientais é uma das deficiências técnicas que impedem a adoção de mecanismos de regulação legal.

Neste cenário, o presente trabalho propõe o estudo dos fungos liqueinizados – tradicionais biomonitoradores das condições atmosféricas – como biomonitoradores de nanotubos de carbono (NTC) suspensos no ar. Para isso, realizou-se um transplante do líquen folioso *Parmotrema tinctorum* para Câmaras de Topo Aberto (CTA) aonde foram expostos a aerossóis de nanotubos de carbono. Os seguintes parâmetros fisiológicos foram medidos: o índice de vitalidade do fotobionte, a eficiência fotossintética, a permeabilidade da membrana e a distribuição de alguns elementos químicos no talo. Realizou-se ainda, além do estudo do talo liquênico, o estudo do fotobionte isolado, *Trebouxia sp*, onde o crescimento, quantidade de clorofila e danos de membrana foram analisados.

A diminuição da taxa de crescimento, a quantidade de clorofila da cultura isolada e danos na membrana celular foram os efeitos negativos observados. A atividade fotossintética (F_v/F_m) não foi alterada em nenhum dos experimentos e, efeitos dose resposta foram observados em uma faixa de concentração para a análise da vitalidade do líquen. Evidências da internalização e bioacumulação dos nanotubos de carbono no líquen e no fotobionte isolado foram descritas.

Nossos resultados apontam para a possibilidade de uso dos fungos liqueinizados como organismos-modelo a serem considerados num contexto de avaliação de risco ambiental de nanopartículas.

Abstract

The development of nanoproducts and nanotechnology, despite current advances, still suffer from the lack of regulation for use, for environmental monitoring and security. The absence of environmental bioindicators is one of the technical obstacles to the adoption of mechanisms of legal regulation.

In this scenario, this thesis proposes the study of lichenized fungi – classical biomonitors of atmospheric pollution - as biomonitors of carbon nanotubes (CNT) suspended in the air. For this, the lichen *Parmotrema tinctorum* was transplanted to Open Top Chambers (OTC) where they were exposed to carbon nanotubes aerosols. The following physiological parameters were measured after treatment: index of photobiont vitality, photosynthetic efficiency, membrane permeability and the distribution of chemical elements inside the thalus. We carried out also the study of the isolated photobiont, *Trebouxia* sp where growth, chlorophyll content and membrane damage were evaluated.

The decrease in growth rate, the amount of chlorophyll of the isolated culture and cell membrane damage are the observed adverse effects. The photosynthetic activity (Fv/Fm) was not changed in any of the experiments and dose response effects were observed in a concentration range. Evidence of internalization and bioaccumulation of carbon nanotubes in the lichen and isolated photobiont are described.

Our results point to the possibility of using the lichenized fungi as model organisms to be considered in the context of environmental risk assessment of nanoparticles.

1. Introdução

Atualmente, o potencial da nanociência e da nanotecnologia em trazer benefícios para a indústria e saúde tem sido reconhecido, fato que explica o aumento de investimentos dos governos e de empresas em várias partes do mundo. Nanoestruturas diversas já estão sendo usadas na indústria de alimentos, cosméticos e de equipamentos eletrônicos. Ainda, inúmeras aplicações inovadoras têm sido reportadas para estudos ambientais, farmacológicos e para a agricultura (Biswas e Wu, 2005). Espera-se que, em poucos anos, o uso de nanoestruturas seja ampliado, resultando em novos nanoproductos disponíveis no mercado.

Entre os diversos tipos de nanopartículas produzidas, os nanotubos de carbono (NTCs) apresentam destaque no contexto dos nanomateriais. Os nanotubos de carbono foram observados pela primeira vez por Sumio Iijima em 1991 (Iijima, 1991) e, devido a propriedades físicas e químicas específicas - tais como alta flexibilidade, condutividade, rigidez estrutural e biocompatibilidade possuem grande potencial de aplicação. Didaticamente, existem dois tipos de nanotubos de carbono (Figura 1): os que possuem uma única parede de carbono sendo denominados de nanotubos de carbono de parede única (SWCNT) e os com múltiplas paredes de carbono concêntricas denominados de nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNT).

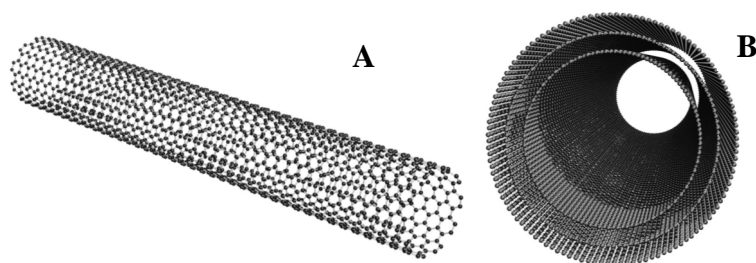


Figura 1 – Em A, nanotubo de carbono de parede única (SWCNT), e, em B, nanotubo de carbono com múltiplas paredes (MWCNT)

Estas nanopartículas de carbono estão sendo utilizadas para preenchimento de painéis de plástico para dissipar a carga durante a pintura de spray, em eletrodos de baterias de lítio, em materiais esportivos como uma raquete de tênis e quadros de bicicletas (De Volter et al, 2013). Existem disponíveis no mercado, atualmente, 38 produtos contendo nanotubos de carbono (Nanotech Project, 2014). As possibilidades de aplicação são ainda mais numerosas, sendo crescentes os volumes de produção e o número de publicações científicas relacionadas à aplicação comercial de nanotubos de

carbono. A capacidade de produção mundial já está acima de 1000 ton/ano (Piccinno et al, 2012; De Volter et al, 2013), conforme ilustrado na Figura 2.

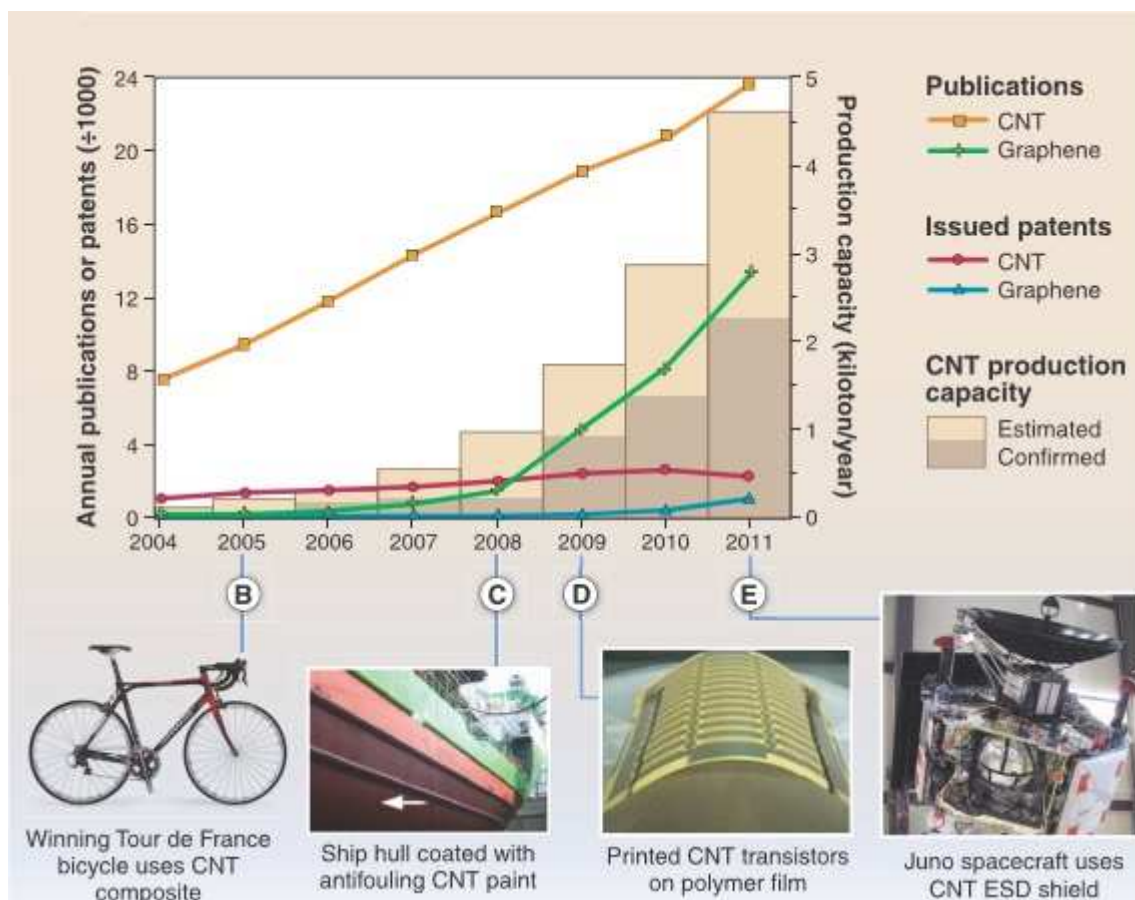


Figura 2 – Tendências em pesquisa e comercialização de NTC. (A) publicações do periódico e patentes mundiais emitidas por ano, juntamente com a capacidade de produção anual estimada. (B a E) NTC produtos relacionados selecionados: quadro composto bicicleta [Foto de cortesia da BMC Switzerland AG], revestimentos anti-incrustantes [Nanocyl], eletrônica impressa [NEC Corporation]; e blindagem descarga eletrostática [Nanocomp Technologies Incorporated]. FONTE: De Volder et al., 2013

No Brasil, desde 1998, foram depositadas 60 patentes no Instituto Nacional da Propriedade Industrial, INPI, relacionadas à nanotubos de carbono, incluindo desde processos de síntese, dispersão e aplicações diversas (INPI, 2014). Alguns exemplos de depósitos desta universidade incluem o nanocompósito de cimento-nanotubo de carbono (PI 0802018-3 de 2008) e o conjugado de nanotubos de carbono para inibir a diferenciação de estruturas de infecção em patógenos vegetais (PI 0912489-6 de 2009). A UFMG possui hoje extenso grupo de pesquisa na área, sendo que em 2008 foi criado o INCT de Nanomateriais de Carbono com sede na UFMG tendo mais de 19 instituições nacionais parceiras. Também em Belo Horizonte está sendo construído o Centro de

Tecnologia de Nanotubos (CTNanotubos), responsável pela produção e aplicação destas nanopartículas em escala industrial.

Enquanto o sucesso da implementação da nanotecnologia é importante para o crescimento da economia global, é também preciso considerar o impacto ambiental gerado como resultado das novas propriedades físico-químicas obtidas. Isto porque a alteração destas propriedades pode resultar em interações biológicas e respostas fisiológicas complexas, não esperadas ou conhecidas (Nel et al, 2013). O uso responsável dessa tecnologia pressupõe uma melhor compreensão do ciclo de vida do nanomaterial e gera a necessidade de desenvolver protocolos para a avaliação de seu impacto ambiental (European Commission, 2012).

Um dos principais desafios da pesquisa na área de nanoecotoxicologia é a escolha dos organismos e dos *endpoints* a serem avaliados numa abordagem realista de exposição (Savolainen et al, 2013; Behra e Krug, 2008). Até esta data, vários estudos (Baun, 2008; Long et al, 2012; Pereira et al, 2014) foram publicados focalizando os efeitos de nanopartículas em organismos aquáticos. Os efeitos citotóxicos devido à exposição aos nanomateriais também já foi descrita, mas existe uma lacuna com relação aos efeitos da exposição atmosférica de nanomateriais na biota.

Os nanotubos de carbono são nanopartículas muito leves e por isso, capazes de permanecer por muito tempo no ar sem depositar, gerando aerossóis com alto potencial de dispersão e, portanto, aumentando a chance de exposição (Savolainen et al, 2013). De acordo com Nel e colaboradores (2013), a exposição atmosférica (essencial para estudos de inalação, por exemplo) é um desafio particular devido às dificuldades técnicas e aos elevados custos envolvidos na simulação dos cenários de exposição.

No contexto da busca de modelos avaliações de risco ambiental, este trabalho tem como objetivo investigar os efeitos de aerossóis de nanotubos de carbono em fungos liqueinizados (ou líquens).

Líquens e biomonitoramento

Em termos de monitoramento ambiental, nessas últimas décadas, o uso de organismos cosmopolitas tem se expandido em estudos relacionados ao meio ambiente. Dentre estes organismos os líquens são amplamente utilizados e estudados. O primeiro estudo utilizando líquens como biomonitores foi publicado ainda no século XIX (Nylander, 1866). Desde então, eles são aplicados a fim de monitorar alterações atmosféricas no ambiente (Herzig et al, 1989; Loppi et al, 1997; Dobben et al, 2001;

Wolterbeek, 2002; Jeran et al, 2007). Tendo como base este histórico, recentemente, foi publicada uma norma internacional padronizando o uso dos líquens como ferramenta para avaliar a qualidade do ar (British Standard Institution, 2014).

Por definição, líquens ou fungos liquenizados são organismos simbióticos onde uma espécie fúngica encontra-se associada a um microorganismo fotossintetizante. O componente fúngico de um líquen (o micobionte) é em geral do filo Ascomycotina, mas existem alguns poucos pertencentes ao filo Basidiomycota. Já o componente fotossintetizante (fotobionte, também chamado de ficobionte em alusão às algas) é na maioria dos casos uma Chlorophyta ou uma cianobactéria, podendo muito raramente ser uma bactéria autotrófica (Nash III, 2008).

Fungos liquenizados são muito sensíveis a gases fitotóxicos, principalmente NOx e SOx, matéria particulada e outros poluentes secundários. Pesquisas têm sido realizadas em diversos países dosando-se metais, compostos sulfurosos e nítricos, ozônio, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), radionuclídeos e outros poluentes atmosféricos (Herzig et al, 1989; Dobben et al, 2001; Wolterbeek, 2002; Jeran et al, 2007; Fuga et al, 2007; Viana, 2010; Rodriguez et al, 2014; Paoli et al, 2014).

De acordo com Nash III (2008), Szczepaniak e Biziuk (2003), Conti e Cecchetti (2001) e outros, a alta sensibilidade dos líquens a diversos poluentes está relacionada à sua biologia. Algumas características específicas, como ausência de sistema vascular, de estômatos e cutícula e ainda a grande dependência nutricional de fontes atmosféricas, fazem dos líquens organismos adequados ao monitoramento de alterações atmosféricas. A ausência destas estruturas tampouco permite excretar as substâncias tóxicas, ou a seleção destas que são absorvidas (Martins-Mazzitelli et al, 2006).

Duas metodologias nos permitem inferir as condições atmosféricas e/ou ambientais através de fungos liquenizados (Conti e Cecchetti, 2001). O primeiro método – biomonitoramento passivo - consiste em mapear a distribuição de espécies epifíticas em diferentes distâncias da fonte poluidora. Tal metodologia tem sido bastante usada (Giordani et al, 2002; Loppi e Corsini, 2003; Szczepniak e Biziuk, 2003; Martins et al, 2008; Rodriguez et al, 2014) com o objetivo de detectar mudanças na qualidade do ar com base na sensibilidade de determinadas espécies a poluentes gasosos. Isso porque a poluição pode ser danosa a algumas espécies - a ponto de eliminá-las ou modificar a frequência de ocorrência destas - alterando, assim, a biodiversidade liquênica da área em questão.

Em outro sentido, utilizando espécies mais resistentes aos efeitos dos poluentes, é possível realizar estudos de biomonitoramento através da análise direta dos poluentes presentes no talo. Assim, com o segundo método, também chamado de biomonitoramento ativo (Herzig et al, 1989) - através da dosagem de poluentes acumulados no talo liquênico de espécies biomonitoras, e/ou pelo transplante de líquens de áreas não contaminadas para áreas contaminadas - é possível avaliar mudanças em parâmetros fisiológicos e morfológicos, e/ou realizar medidas de bioacumulação de poluentes a fim de inferir sobre as condições atmosféricas do local de estudo. O desenvolvimento de anormalidades, como o branqueamento da clorofila e o desenvolvimento de áreas pardas no talo, inibição do crescimento e desenvolvimento, alterações nos processos metabólicos e mudanças anatômicas e morfofisiológicas são alguns dos efeitos que os poluentes podem ocasionar na comunidade liquênica (Martins et al, 2008).

A técnica de transplante, uma das formas de realizar o biomonitoramento ativo, é largamente utilizada em diversos países e permite realizar experimentos laboratoriais testando o efeito da exposição dos líquens a substâncias ou partículas específicas com características poluentes em potencial (Loppi e Frati, 2006; Conti et al, 2009; Paoli et al, 2009, 2014).

No entanto - apesar de ser um tipo de monitoramento já tradicional, em muitas partes do mundo há muitas décadas, o estudo da liquenologia ainda é pouco desenvolvido no Brasil. A região Sul do Brasil concentra a maior parte dos estudos utilizando líquens como biomonitores ativos, e a região Nordeste e Sudeste apresenta estudos pontuais nesta área (Cruz et al, 2009; Martins et al, 2010; Silva et al, 2014). Nestes trabalhos, em alguns casos, foram realizadas análises cromatográficas a fim de inferir sobre as alterações metabólicas gerais e a observação de alterações morfológicas no talo liquênico. Estudo realizado na cidade de Porto Alegre analisou alterações morfofisiológicas e genotóxicas com vias de biomonitorar a atmosfera através do transplante de líquens (Kaffer et al, 2012). Em Minas Gerais foi publicado apenas um estudo preliminar utilizando líquens como biomonitores passivos de elementos traço na atmosfera (Viana et al, 2011).

2. Justificativa

Apesar de existirem naturalmente, diversas fontes derivadas de atividades humanas podem resultar na formação de nanopartículas, tais como: emissões industriais, veiculares e de incineradores. Uma vez emitidas na atmosfera, elas são transformadas, resultando em alterações de tamanho e composição, e por processos de deposição, podem entrar em contato com o solo e corpos d'água (Biswas e Wu, 2005). A nanotecnologia surge, como uma nova fonte de nanopartículas, com potencial de alterar a sua disponibilidade nos compartimentos ambientais (solo, ar, água). Enquanto as nanopartículas naturais são componentes-chave no ecossistema, como produtos de intemperismo químico e de processos biológicos, o comportamento das nanopartículas manufaturadas e dos nanoproductos no meio ambiente ainda é desconhecido (Guzmán et al, 2006).

De acordo com Anastasio e Martin (2001), as nanopartículas quando presentes na atmosfera são de interesse crescente por dois motivos: por serem importantes precursoras na formação de partículas maiores, com forte influência sobre o clima global, química da atmosfera, visibilidade e transportes regional e global de poluentes e nutrientes biológicos, e, por poderem atuar nos efeitos deletérios da poluição atmosférica na saúde humana. (Anastasio e Martin, 2001).

Análises epidemiológicas têm relacionado a composição da atmosfera com diversos efeitos adversos à saúde, incluindo aumento no risco de doenças cardiopulmonares e respiratórias com redução da expectativa de vida (WHO, 2004; Perera et al, 2006; Freitas et al, 2009). No entanto, não existe consenso sobre que tipo ou tamanho de partícula atmosférica seja a mais responsável por estes efeitos. Com relação às nanopartículas, estudos com animais têm fornecido evidências de que algumas nanopartículas (ou partículas ultrafinas) podem ser parcialmente responsáveis pelos danos associados às partículas presentes na atmosfera (Donaldson, 2000; Oberdorster, 2001, 2010). O tamanho reduzido e a possibilidade de acumulação destas partículas são algumas hipóteses que têm sido levantadas com relação a sua provável toxicidade (Anastasio e Martin, 2001; Oberdorster, 2010). No entanto, ainda se discute os parâmetros para avaliar a toxicidade das nanopartículas e se estes devem diferir do utilizado para as partículas "clássicas", não sendo ainda padronizados os protocolos para avaliações de risco destes novos materiais. Até o momento, não foi observado nenhum parâmetro específico que pode prever o risco de qualquer nanopartícula. Nenhum novo, ou

inesperado, mecanismo de toxicidade aguda foi identificado comparando do que se conhece para particulados em geral (Nanosafety Cluster Review, 2014).

De acordo com Jackson e colaboradores (2013), foram publicados ainda poucos estudos relevantes do ponto de vista de avaliações de risco aos NTCs. Neste contexto, os mecanismos de toxicidade humana são mais estudados, sendo ainda maiores as lacunas relacionadas às pesquisas de ecotoxicidade, que contemplem a identificação do dano e avaliações de efeitos/exposição aos nanotubos de carbono no ambiente.

Além do tamanho, a toxicidade dos NTCs pode ser influenciada por diversos fatores como a área de superfície, a química da superfície (com adição ou não de grupos funcionais, ou de recobrimentos), a carga, a agregação e a forma dos tubos (Jackson et al, 2013). Estas características podem ser alteradas através do tratamento químico dos nanotubos, o que resulta em vários tipos de NTCs disponíveis. A forma interação desta nanopartícula com a biota dependerá destas propriedades, e por conseguinte, também seu potencial tóxico.

O uso de biomonitores em estudos sobre impacto das nanopartículas no ambiente ainda é insipiente. Consulta recente à algumas bases de dados de literatura científica encontrou entre 10 e 167 artigos sobre o assunto, publicados a partir de 2010, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 -Resultado da pesquisa sobre biomonitoramento de nanopartículas em bases de dados de literatura científica

Termos pesquisados	“Bioindicator” e “Carbon nanotube”	“Bioindicator” e “Nanoparticle”	“Biomonitor” e “Nanoparticle”	“Biomonitor” e “Carbon nanotube”	“Biomonitor” e “Carbon nanotubes”
Pubmed	0	0	0	0	0
Google Academics	53	167	70	23	42
Elsevier Science Direct	17	42	17	10	10

Pesquisa realizada em 04/12/2014

Foram publicados trabalhos analisando alterações fisiológicas e comportamentais de organismos aquáticos, como algas e invertebrados, e em plantas superiores quando expostos à nanopartículas de carbono (Baun et al, 2008; Ghodake et al 2010; Schwab et al, 2011; Begun et al, 2011 Khodakovskaya et al, 2012). Efeitos positivos, como incentivo

de crescimento (Liu et al, 2009; Baun et al, 2008) e também negativos, como redução da atividade fotossintética e morte celular (Ghodake et al 2010; Schwab et al, 2011) são relatados. Ainda é questionável se estes efeitos são secundários ou indiretos, devido à formação de agregados de nanotubos de carbono na superfície do organismo (Ghodake et al 2010; Schwab et al, 2011; Begun et al, 2011).

Sobre os impactos relacionados à presença das nanopartículas na atmosfera, estudos estão sendo conduzidos utilizando animais (Donaldson et al, 2000; Oberdorster, 2001), sendo que, trabalhos utilizando biomonitorios das condições atmosféricas, líquens ou outros, de nosso conhecimento ainda não foram realizados.

Considerando, portanto, a emergência de estudos na área de monitoramento das nanopartículas no meio ambiente, é proposto neste trabalho, o uso de líquens, organismos consagrados como biomonitorios, no estudo da ação de aerossóis de uma nanopartícula manufaturada no talo líquênico. Os nanotubos de carbono de parede múltipla foram escolhidos por possuírem diversas aplicações e por sua facilidade de obtenção.

3. Objetivos

Monitorar e avaliar a ação morfofisiológica da exposição de fungos liqueinizados a aerossóis de nanotubos de carbonos, a fim de verificar a possibilidade de uso deste organismo como biomonitor de nanotubos de carbono na atmosfera.

Objetivos específicos

- desenvolver metodologia para detecção de nanopartículas na fase aérea, através de suas interações com fungos liqueinizados.
- inferir o potencial tóxico dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas quando dispersos na atmosfera através da análise de danos morfológicos e fisiológicos em líquens.
- verificar se ocorre bioacumulação dos nanotubos de carbono, através da análise do talo líquênico e das células isoladas do fotobionte
- verificar o potencial tóxico dos nanotubos de carbono para o fotobionte isolado do líquen,
- inferir sobre a possibilidade de uso de líquens como biomonitores de nanotubos de carbono na atmosfera.

4. Materiais e Métodos

A descrição dos materiais e métodos foi dividida em cinco itens: Nanotubos de Carbono, Líquen – *Parmotrema tinctorum*, Câmaras de Topo Aberto – CTA, Exposição dos Líquens e Exposição do Fotobionte Isolado – *Trebouxia sp.*

4.1 Nanotubos de carbono

4.1.1 Síntese e funcionalização dos nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT)

Os nanotubos de carbono utilizados no trabalho foram sintetizados por CVD (deposição química na fase vapor) no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG. Este método de síntese consiste na decomposição térmica de hidrocarbonetos leves (metano, acetileno, etileno) como precursores de carbono utilizando catalisadores metálicos (no caso, Fe, Co, MgO) sob pressão atmosférica e temperaturas entre 600 e 1000°C.

No presente trabalho, nanotubos de carbono não funcionalizados e funcionalizados foram utilizados. Parte da amostra obtida no Laboratório de Nanomateriais foi funcionalizada também no Departamento de Física para a realização de alguns dos testes toxicológicos. A funcionalização se deu pela adição de grupos carboxila na superfície do tubo através de protocolo de oxidação adaptado de Xing et al (2005) e Datsyuk et al (2008). Este processo resultou na amostra MWCNT-COOH. A funcionalização dos nanotubos através de métodos químicos proporciona a interação dos NTCs com outras substâncias e materiais, como polímeros, solventes orgânicos e água.

Já nas etapas do trabalho que foram desenvolvidas na Universidade de Trieste (durante período de doutorado-sanduiche na Itália), os MWCNT (amostra aqui denominada MWCNT_IT) foram comprados na empresa Nanostructured & Amorphous Materials Inc. (Houston, TX 77084, USA) e funcionalizados no Departamento de Química da Universidade de Trieste. A funcionalização da amostra MWCNT_IT, neste caso, seguiu protocolo para a adição covalente de grupos amino na superfície do tubo (MWCNT-NH⁺₃) (Georgakilas et al, 2002). Parte da amostra de MWCNT-NH⁺₃ foi refuncionalizada para a adição de um marcador fluorescente, o isocianato de fluoresceína (FITC), para a realização dos testes de bioacumulação no fotobionte, de acordo com protocolo publicado por Campidelli et al (2006).

4.1.2 Caracterização dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)

A caracterização das amostras de nanotubos de carbono é essencial e objetiva conhecer ou confirmar algumas propriedades, como diâmetro, comprimento, pureza e presença de defeitos estruturais nos tubos. Estas características influenciam na forma de interação do nanomaterial com o meio, e portanto, nos efeitos deste em organismos vivos. Os quatro tipos de amostras de nanotubos (MWCNT_IT e MWCNT - não funcionalizadas - e, MWCNT-NH⁺³ e MWCNT-COOH - funcionalizadas) utilizadas no presente trabalho foram caracterizadas utilizando as seguintes técnicas:

- Termogravimetria (TG)

As análises TG e de sua derivada, DTA, foram feitas simultaneamente em um equipamento TG/DTA da TA Instruments, modelo SDT 2960, pertencente ao Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG. Utilizou-se, aproximadamente, 3 mg de nanotubo de carbono, usando uma razão de fluxo de 5°C/min, com uma faixa de temperatura de 50 a 900°C e em atmosfera de ar seco com fluxo de 100 mL/min.

- Espectroscopia Raman

Os dados Raman foram obtidos usando o espectrômetro “Andor Technology Sharmrock Sr 303i” pertencente ao Laboratório de Espectroscopia Raman do Departamento de Física da UFMG. Utilizou-se uma objetiva de imersão à óleo com aumento de 60x, e o laser He-Ne no comprimento de onda 561,4nm para excitação da amostra.

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET)

Todas as imagens de Microscopia Eletrônica foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG; as de Varredura (MEV) obtidas no microscópio equipado com canhão FEG (Field Emission Gun), modelo Quanta 200 FEG fabricado pela FEI; e as de Transmissão (MET) no microscópio modelo Tecnai G2, também fabricado pela FEI.

Para a amostra marcada com FITC (utilizada apenas nos testes de internalização no fotobionte) foram ainda realizadas leituras espectrofotométricas a fim de confirmar a funcionalização através da leitura do espectro de emissão da amostra em 517nm.

4.2 *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale

4.2.1 Identificação morfológica da espécie, coleta e transplante

A definição da espécie a ser utilizada no trabalho se deu com base na facilidade de identificação, ocorrência e seu uso em estudos de biomonitoramento no Brasil. A fim de definir o procedimento para identificação e coleta, visitas foram realizadas à Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo e à Fundação ZooBotânica de Porto Alegre. Com base nestas informações e nas chaves de identificação dos seguintes autores: Fleig e Filho (1990); Eliasaro e Donha (2003); Canêz e Marcelli (2006); Marcelli e Benatti (2008); Spielmann e Marcelli (2008); Benatti e Marcelli (2009); Spielmann (2009); Marcelli e Benatti (2010a); Marcelli e Benatti (2010b) desenvolveu-se uma ficha de caracterização para identificação em campo da espécie de interesse (*Parmotrema tinctorum*). A ficha de caracterização (disponibilizada no capítulo “Anexos”, no Anexo 1) compreende informações referentes à localização (coordenadas geográficas), diâmetro do tronco, espécie arbórea, direção de exposição (direção N), altura da amostra em relação ao solo (maior que 1m), tamanho do talo (entre 7 e 10 cm de diâmetro), tamanho dos lobos, presença de isídios no córtex superior, cor do córtex inferior e reações químicas na medula (testes K e C). Desta forma, a espécie *Parmotrema tinctorum* (Figura 3) foi pré-identificada em campo antes de ser retirada do substrato.

As principais características observadas na pré-identificação foi a coloração esverdeada/acinzentada, o tamanho dos lobos (~ 1cm), as bordas não presas ao substrato, a presença de isídios (estruturas de reprodução), o córtex inferior negro e o teste C positivo vermelho.



Figura 3 – Amostra de *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale

A coleta para os experimentos-teste foi realizada na Estação Ecológica da UFMG, conforme descrito em Vaz (2012). Já para os experimentos dentro das câmaras de topo aberto, as coletas foram realizadas no mês de outubro de 2013 na região do Alto Palácio dentro dos limites do Parque Nacional da Serra do Cipó. A devida autorização para retirada dos espécimes foi obtida junto ao Ministério do Meio Ambiente (SISBIO número 40244-1, cópia disponível no Anexo 2).

O protocolo de coleta e transplante foi adaptado de trabalhos como Viana et al, (2011), Kaffer et al. (2012), Bertuzzi e Tretiach (2013) e Tretiach et al (2012), tendo como base estudos sobre a viabilidade dos líquens após períodos de congelamento (Honegger, 2003). Após preenchimento da ficha de caracterização e pré-identificação da espécie e parâmetros de interesse, o espécime foi removido do tronco com auxílio de uma faca de aço inoxidável e colocado num envelope de papel. Chegando ao laboratório a amostra foi limpa com auxílio de pinças sob um microscópio estereoscópico para a remoção de pedaços do tronco, ovos de insetos, etc. Após a limpeza, seguiu-se a confirmação da espécie através da caracterização morfológica mais detalhada (a ficha de caracterização completa está disponível no Anexo 3).

Após a confirmação da espécie, cada espécime de *P. tinctorum* foi dividido em cortes radiais em sete partes, com tamanhos e pesos similares (aproximadamente 35mg). Cada parte corresponde a um grupo, por exemplo: A-pré-exposição, B-controle1, C-controle2, D-tratamento1, E-tratamento2. Os fragmentos do talo de diferentes indivíduos foram agrupados e colocados numa placa de Petri. As amostras, exceto as do grupo A, foram mantidas por 3h para desidratar sobre sílica gel, e as placas de Petri foram, então, seladas e colocadas em sacos plásticos de onde o ar foi removido utilizando um equipamento comercial para formação de vácuo. Este material foi então mantido a -20°C até a execução do experimento de exposição. Dois dias antes da exposição ou análises, o grupo de amostras de interesse foi mantido à temperatura ambiente, sem a abertura do saco plástico, por 4h, e depois mantido completamente hidratados por 48h.



Figura 4 - Preparação para a exposição das amostras de *P. tinctorum*. À esquerda, os fragmentos do talo prontos para serem expostos, e à direita, etapa de condicionamento das amostras

Após o condicionamento, cada fragmento foi fixado com fios de nylon (Figura 4, à esquerda) num pedaço de cortiça para ser então colocado no interior da Câmara de Topo Aberto (CTA). A posição dentro câmara obedeceu a direção de exposição anterior, ou seja, os fragmentos de talo devem ser mantidos na direção sul de exposição à luz solar.

4.2.3 Identificação molecular

De forma complementar, um pequeno pedaço do talo de cada espécime foi recortado e submetido à extração do DNA total, a fim de executar uma caracterização molecular da espécie. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Whiting, et al. (1997), com modificações.

A integridade e a concentração do DNA obtidos foram analisadas utilizando espectrofotômetro e gel de agarose. O DNA foi então utilizado como molde em reações

para amplificação do segmento de DNA que abrange a região de código de barras proposta para a identificação de fungos (Schoch et al, 2012). Foram utilizados pares de iniciadores (primers) ITS4 e 5 para a amplificação e os produtos obtidos foram enviados para sequenciamento no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou da Fiocruz. As sequências obtidas no sequenciamento foram comparadas em busca de similaridade no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

4.3 Câmaras de topo aberto - CTAs

As câmaras de topo aberto, CTAs, são amplamente utilizadas em estudos de monitoramento atmosférico por permitirem a inserção e o controle da concentração de poluentes dentro da câmara sem que outros fatores climáticos como temperatura, umidade e luminosidade sejam demasiadamente alterados (Andre, 2007; Clebsch et al, 2009). Assim, pode-se alterar um elemento entre os ambientes externo e interno à câmara, sem a modificação das outras características ambientais.

Duas câmaras de topo aberto foram projetadas e construídas para realizar a exposição dos líquens à uma atmosfera enriquecida com nanotubos de carbono em suspensão. Abaixo, na Fig. 5, esquema ilustrativo da CTA:

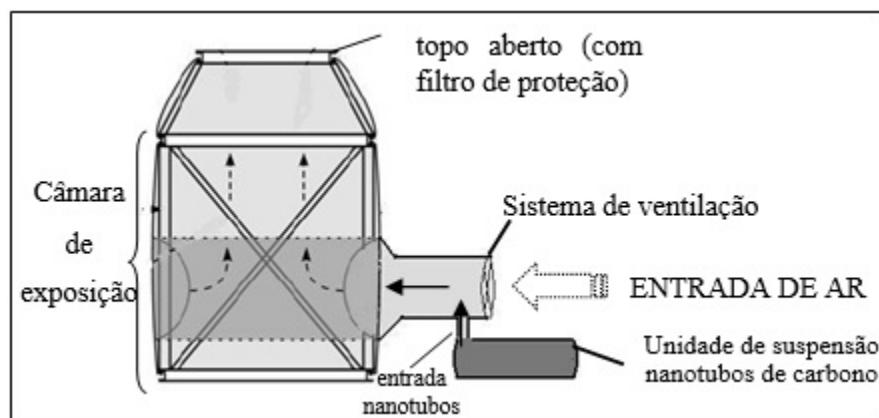


Figura 5 - Esquema ilustrativo da câmara de topo aberto e sistemas (Adaptado de Andre, 2007)

Conforme demonstrado no esquema, a CTA construída é composta por uma câmara de exposição acoplada a um sistema de ventilação e à uma unidade de suspensão de NTCs.

A câmara de exposição é a principal estrutura da CTA, onde foram colocadas as amostras de líquens. Diretamente conectado a esta câmara está o sistema de ventilação que insufla ar captado no ambiente externo promovendo contínua renovação do ar na CTA. A abertura na parte superior da câmara permite o deslocamento do ar e sua renovação. A unidade de suspensão foi especialmente desenvolvida para o trabalho e é responsável pela formação da suspensão de nanotubos de carbono. Esta unidade permite o estudo dos efeitos dos nanotubos de carbono não funcionalizados, na fase sólida, simulando, dentro da câmara de exposição, o comportamento de deposição seca destas nanopartículas no ambiente.

As CTAs foram instaladas no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN, localizado dentro do Campus Pampulha da UFMG. Elas são constituídas por uma estrutura metálica (118 cm de diâmetro por 163 cm de altura) revestida por policarbonato transparente, permitindo a entrada de luz natural. Sensores de umidade e temperatura foram instalados no interior das câmaras.

Por se tratar de um novo modelo experimental (considerando o uso dos nanotubos de carbono), a calibração deste equipamento é etapa imprescindível. Para tanto, testes foram realizados a fim de confirmar a formação e distribuição do aerossol de NTCs na câmara de exposição. Nestes experimentos, fitas de carbono (com superfície autocolante) foram colocadas sobre ímãs de neodímio em diversos pontos no interior da câmara de exposição, como armadilhas. Os nanotubos de carbono que utilizamos são magnéticos, por isso o uso dos ímãs. O gradiente de NTC a ser colocado na unidade de suspensão foi definido com estes experimentos. A detecção dos NTCs nas armadilhas foi realizado por microscopia eletrônica de varredura.

4.4 Exposição dos líquens

4.4.1 Estudos preliminares - Vitalidade e bioacumulação

Utilizando a amostra de MWCNT funcionalizada com o grupo carboxila, foram preparadas 9 dispersões em água deionizada com concentrações de 0,001µg/mL a 100 µg/mL de nanotubos de carbono. Dois espécimes de *P. tinctorum* foram coletados na Estação Ecológica da UFMG e fotografados. A partir da edição da fotografia de cada amostra um mapa foi desenvolvido, possibilitando a administração de doses periódicas no mesmo local onde foi anteriormente aplicada a dispersão. As bordas das amostras foram tratadas com as dispersões de nanotubos de carbono e de outras nanopartículas, conforme ilustrado pela imagem abaixo (Figura 6).

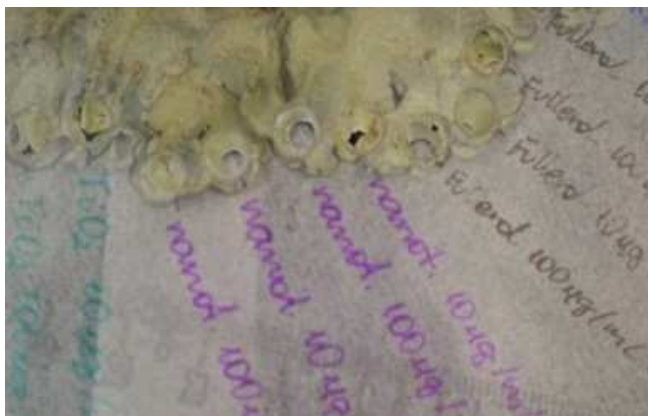


Figura 6 - Experimento preliminar utilizando o mapa feito a partir de foto da amostra para repetição da aplicação de NTCs na borda do líquen

A área demarcada pelo mapa foi tratada com 5µL da dispersão de nanopartículas e, após 5 dias o procedimento foi repetido. As amostras foram mantidas no laboratório, a temperatura ambiente, com iluminação natural. A área tratada foi removida e, em seguida, foi analisada a vitalidade do fotobionte conforme descrito em Kaffer et al (2012).

Para os testes de bioacumulação, a parte do talo do líquen previamente tratado com NTCs foi raspado (com adição de uma gota de água) no momento da análise possibilitando a observação em vivo de células do fotobionte. Uma gota do raspado (córtex) foi colocada na lâmina. O micobionte não foi analisado. As análises foram feitas por Microscopia Raman Confocal através da observação da imagem da célula e obtenção do espectro Raman característico dos nanotubos de carbono e pela obtenção de imagens de microscopia eletrônica de varredura.

4.4.2 Exposição dos líquens na CTA

A fim de examinar as relações de causa-efeito em uma abordagem ambiental mais realista, as amostras de líquens foram transplantadas para as CTAs, uma para amostras controle, e a outra (conectada à unidade de suspensão de NTCs, para os tratamentos).

Dois desenhos experimentais distintos foram realizados, utilizando uma amostra de nanotubo de carbono funcionalizado (MWCNT-COOH disperso em água destilada) e o outro utilizando o MWCNT não funcionalizado, como um aerossol seco. Para o primeiro experimento, as amostras de líquens foram cuidadosamente colocadas dentro de uma câmara de topo aberto, lado a lado, e diariamente pulverizadas com 0,01, 1,0 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dispersão de água MWCNT-COOH. As amostras foram tratadas durante 15 dias, juntamente com o controle positivo (dispersão de carvão ativado a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o negativo (água destilada).



Figura 7 – Distribuição das amostras de líquens dentro da câmara de topo aberto, à esquerda, e as dispersões de MWCNT-COOH em água utilizadas para a exposição, à direita

em um segundo experimento, as amostras foram expostas ao aerossol seco de MWCNT. Em uma câmara foram dispostas as amostras controle, e na outra as amostras a serem tratadas. Para cada quantidade de nanotubo na câmara de tratamento, havia um grupo controle na segunda câmara. Diariamente, durante 7 dias consecutivos, uma determinada quantidade de nanotubos de carbono foi diariamente inserida na unidade de suspensão, formando uma atmosfera enriquecida de MWCNT. Quatro tratamentos foram executados: os líquens foram expostos a uma atmosfera enriquecida de 0,01, 0,1 e 0,5 g

de MWCNT por m^3 durante 7 dias e, um grupo de amostras foram tratadas de forma contínua, durante 21 dias.



Figura 8 – Câmaras de Topo Aberto durante exposição dos líquens ao aerossol seco de MWCNT

Dentro das CTAs, todas as amostras foram colocadas de frente para a direção sul de exposição, uma vez que encontravam-se nesta posição em campo. O tratamento ocorreu no início das manhãs, quando a umidade relativa do ar está mais elevada. Temperatura e umidade relativa do ar foram monitoradas dentro ambas as câmaras e fitas autocolantes para microscopia foram colocadas lado a lado às amostras de líquens e em outros pontos, para confirmar o alcance e distribuição dos nanotubos no interior da câmara. Imagens SEM foram obtidas das fitas e da superfície dos líquens.

4.4.3 Análises fisiológicas e de bioacumulação nos líquens

Logo após o período de exposição, as amostras foram retiradas da CTA e levadas para o laboratório para medir sua atividade fotossintética, danos de membrana e análise elementar.

4.4.3.1 Análise da Fotossíntese

A quantidade de clorofila nas amostras foi estimada pela emissão da fluorescência da clorofila *a* medida através do fluorômetro Mini-Pam cedido pelo Laboratório de Fisiologia do Departamento de Botânica deste Instituto. No laboratório, condicionou-se as amostras da seguinte forma: os fragmentos de talo foram colocados em placas Petri contendo papel umedecido no fundo, sobre lâminas de vidro (para evitar o contato direto com a água e o papel). As placas foram fechadas e mantidas numa câmara a 20°C e $20 \mu\text{mol f\u00f3tons s}^{-1} \text{m}^{-2}$ por 2 dias. Duas vezes ao dia as amostras foram imersas em água por 3 min, para garantir sua completa hidratação. No momento das medidas as amostras foram imersas por 3min em água e mantidas por 30min no escuro. O rendimento quântico máximo (F_v/F_m), que caracteriza o potencial do fotossistema II (PS II), foi medido nos

talos previamente condicionados. A obtenção das medidas com o fluorômetro em amostras de líquens segue protocolos publicados em Bertuzzi e Tretiach (2013), Piccoto et al (2011) dentre outros.

4.4.3.2 Dano de membrana

Após a medida da eficiência fotossintética as amostras foram mantidas sob agitação em 25mL de água deionizada, a 20° C, por 1h para medida da variação da condutividade elétrica (Munzi et al, 2009). Células com a membrana danificada tem sua permeabilidade alterada, resultando na perda de eletrólitos, principalmente íons K⁺, o que resulta na alteração da condutividade elétrica da água onde o líquen foi submerso.

Sendo análises não-destrutivas, após o registro das medidas, as mesmas amostras foram mantidas a -20°C, até a realização do protocolo de análise elementar.

4.4.3.3 Análise elementar

Aos fragmentos de talo descongelados aplicou-se, então, o protocolo de lavagem sequencial adaptado de Brown and Brown (1991) e Figueira e colaboradores (2009). Com base no processo de troca catiônica, este protocolo permite a identificação de material particulado insolúvel (absorvido por deposição seca) nos diversos extratos do líquen: intercelular, intracelular e extracelular.

De forma geral, realiza-se uma sequência de lavagens – primeiro água deionizada (para remover elementos solúveis da fração intercelular), depois cloreto de níquel (para remover elementos ligados à parede celular) – seguida pela lavagem com ácido nítrico que tem como objetivo o rompimento celular e liberação do último extrato, os elementos presentes dentro da célula. Assim, é possível inferir sobre aspectos fisiológicos relacionados à perda celular de elementos essenciais, como K, Ca, Na e Mg.

Após execução do protocolo de lavagem, tendo todos os extratos separados, as amostras foram enviadas para realização da análise elementar por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES) no CDTN.

Ainda, devido às impurezas presentes no nanotubos de carbono, resultantes do uso de catalizadores metálicos no processo de síntese, foi também possível inferir a bioacumulação dos NTCs no talo do líquen. A concentração elementar da amostra de MWCNT foi também enviada para análise elementar para permitir este monitoramento.

4.5 Exposição do fotobionte isolado – *Trebouxia sp*

No laboratório de líquenologia da Universidade de Trieste, a alga verde *Trebouxia sp* foi isolada do líquen *Parmotrema perlatum* (Huds.) M. Choisy de acordo com protocolo descrito em Yamamoto (2002). Após o isolamento, as células foram inoculadas em placas de Petri contendo meio sólido TM, “3 Nitrogen *Trebouxia*”, e mantidos numa câmara de crescimento a 20°C, sob um ciclo 14/10h de claro/escuro (condições de iluminação: 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

As células do fotobionte foram expostas a três concentrações de MWCNT-NH³ (0,01; 1,0 e 100 $\mu\text{g/mL}$) em duas condições:

- a) através da re-suspensão das células em uma dispersão de nanotubos, antes da inoculação em membranas de acetato ou discos de fibra e,
- b) através da inoculação das células em membranas de acetato ou discos de fibra de vidro contendo nanotubos de carbono na superfície.

Para o primeiro tipo de interação, os NTC foram dispersos em água Milli-Q nas três concentrações. As células foram removidas do meio sólido e re-suspendidas em água. Uma alíquota desta solução foi adicionada às dispersões de NTC e deixada durante 1 h sob agitação constante (120 rpm). Em seguida, uma parte desta solução foi inoculada nas membranas de acetato e nos discos de fibra de vidro por meio de filtração em vácuo. Para o segundo tipo de interação, as dispersões NTC foram previamente depositadas sobre a superfície dos discos por meio de filtração em vácuo para se obter uma distribuição homogênea. Em seguida, uma parte da suspensão de algas (sem NTC) foi inoculado sobre os discos. A densidade de algas da re-suspensão inicial inoculada em ambos os discos e tipos de exposição foi calculada utilizando uma câmara de sedimentação. Todos os procedimentos de re-suspensão, filtração e inoculação foram realizados dentro de uma capela estéril, e todo o material foi previamente esterilizado. Após a inoculação, os discos tratados – de acetato e de fibra de vidro, para cada tipo de interação - foram mantidos no interior de uma câmara de crescimento durante 21 dias, em condições de cultivo, em placas de Petri lacradas contendo o meio sólido TM, em conjunto com os controles. Cada tratamento foi repetido seis vezes.

Após 21 dias foram analisados os seguintes parâmetros fisiológicos:

- Atividade fotossintética

A atividade fotossintética das células de *Trebouxia* foi medida usando o mesmo protocolo para a análise dos líquens. O disco onde houve o crescimento possibilitou a sustentação

da cultura o que possibilitou o uso do mesmo acessório do fluorômetro Mini-Pam (*clip holder 2030-B*). Neste caso, o Mini-Pam era acoplado a um computador e o software WinControl – V1.93, 2001, Walz foi usado para aquisição dos dados em tempo real.

- Quantificação da clorofila

As clorofilas *a* e *b* foram extraídas usando o solvente DMSO. Parte do disco contendo as células foram mantidos no solvente, por 1h, em banho quente a 65°C. Em seguida, realizou-se 2 ciclos de centrifugação de 10min a 10000g. No espectrofotômetro, a absorvância foi medida a 750nm (checar a turbidez), a 649nm e 480nm.

Para calcular a concentração (expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$) as equações conforme Wellburn (1994) foram utilizadas.

O crescimento celular também foi monitorado, semanalmente, através de registros fotográficos obtidos por câmera fotográfica digital acoplada a um microscópio estereoscópico.

- Danos na membrana

Esta análise foi realizada por microscopia confocal de células coradas com Sytox Green. Partes dos discos contendo as células foram incubados por 15min em 30 μL de solução aquosa de Sytox Green (5 μM). O microscópio utilizado para a visualização (C1-si, Nikon, Tokyo, Japan) equipado com um laser de argônio a 488nm, e o sinal do corante foi adquirido numa janela entre 515/30nm. As imagens foram elaboradas utilizando o software Nikon EZ-C1 FreeView e ImageJ.

Este método permite a determinação da viabilidade celular porque SytoxGreen não passa por membranas intactas, mas facilmente penetra membranas danificadas, ligando-se a ácidos nucleicos no interior das células e assim emitindo fluorescência (emissão máxima em 523nm).

4.5.1 Testes de bioacumulação de NTCs no fotobionte

Na Universidade de Trieste, utilizando a mesma cultura das análises fisiológicas, foram realizados outros testes sobre a internalização dos nanotubos de carbono funcionalizados com FITC (conforme descrito acima) nas células de *Trebouxia* sp (isolada de *P. perlatum*).

Para tanto, parte da cultura de algas foi re-suspendida em três dispersões - 1mg/mL, 0,01mg/mL, 0,0001 mg/mL - de MWCNT-FITC. As dispersões resultantes foram mantidas em agitação constante, a 120 rpm, sendo que após 3, 6 e 24h, alíquotas

foram retiradas para observação por microscopia confocal. As imagens foram obtidas utilizando as objetivas de imersão à óleo de 20x e 60x, os lasers 488nm (25%) e 637nm (10%) e os detectores 516/30, 590/50, 650LP.

4.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método One Way Repeated Measures Variance Analyses of Variance (ANOVA) através do algoritmo Sigma Plot 13 Software, para os resultados obtidos com a exposição dos líquens. O teste não paramétrico Mann-Whitney (no GraphPad Prism Software) foi utilizado para os resultados da exposição da alga isolada. Valores de $P \leq 0.01$ ou $P \leq 0.05$ foram considerados significantes. Para os testes preliminares 3 réplicas foram usadas, para os experimentos nas CTAs cada tratamento foi replicado 6x, assim como os experimentos isolados. Este último, foi ainda repetido uma vez (foram 2 sets de experimentos, com a mesma duração, mas em períodos diferentes).

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização dos nanotubos de carbono

A caracterização dos NTCs é essencial e objetiva obter informações como grau de pureza, ordenamento, comprimento e diâmetro dos tubos.

A amostra de MWCNT sintetizada no Departamento de Física apresenta aproximadamente 97% de pureza e menos de 3% de resíduos, conforme resultado da análise de termogravimetria TG e de sua derivada DTG.

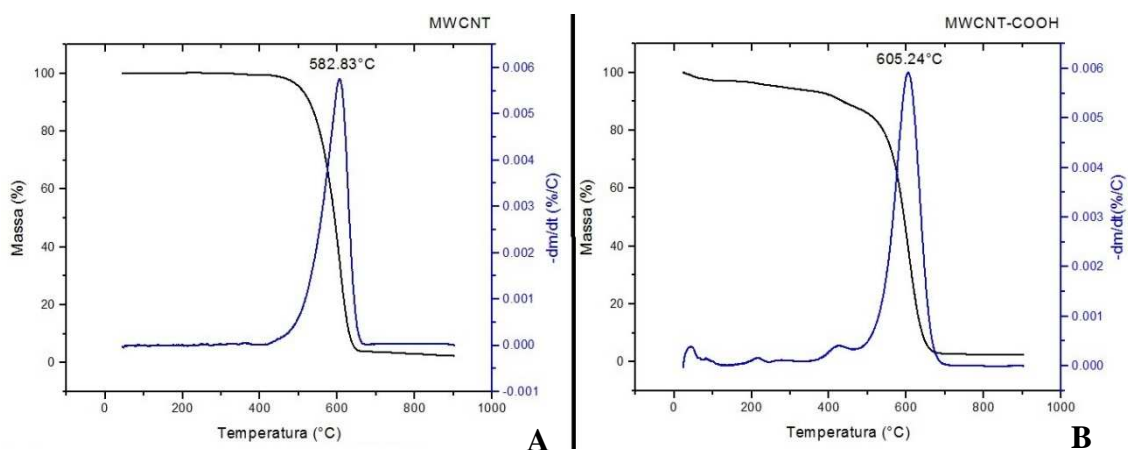


Figura 9 – (A) Análise de termogravimetria da amostra de MWCNT, e (B) da amostra funcionalizada MWCNT_COOH. Em preto a curva TG e em azul sua derivada DTG

Pela curva TG da amostra não funcionalizada observa-se um único estágio de decomposição em ambas amostras entre 500 e 650 °C. A curva DTG confirma o alto grau de pureza da amostra, pela presença de apenas um pico com perda de quase 97,5% da massa inicial. O resíduo de 2,5% indica a presença de impurezas, e provavelmente deve-se aos metais utilizados como catalizadores (MgO, Co e Fe) na síntese do MWCNT. Já a TG e DTG da amostra funcionalizada, MWCNT_COOH, demonstram sucessivas perdas de massa em temperaturas menores, com presença de picos até 500°C. O processo de funcionalização possivelmente gerou outros fragmentos, como carbono amorfo e debris de oxidação, além da presença de grupos carboxilados e carbonilados na superfície dos tubos. É possível notar ainda, o aumento da estabilidade térmica do nanotubo após a funcionalização, com pico da temperatura de queima em 605,24°C.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV, (Fig. 10) demonstram o alto poder de agregação dos nanotubos de carbono, que comumente estão agrupados formando feixes e grumos. Devido às interações de van der Waals formadas entre as

superfícies hidrofóbicas de grafeno, os nanotubos minimizam sua energia livre superficial formando agregados, sendo após sua síntese, inertes quimicamente.

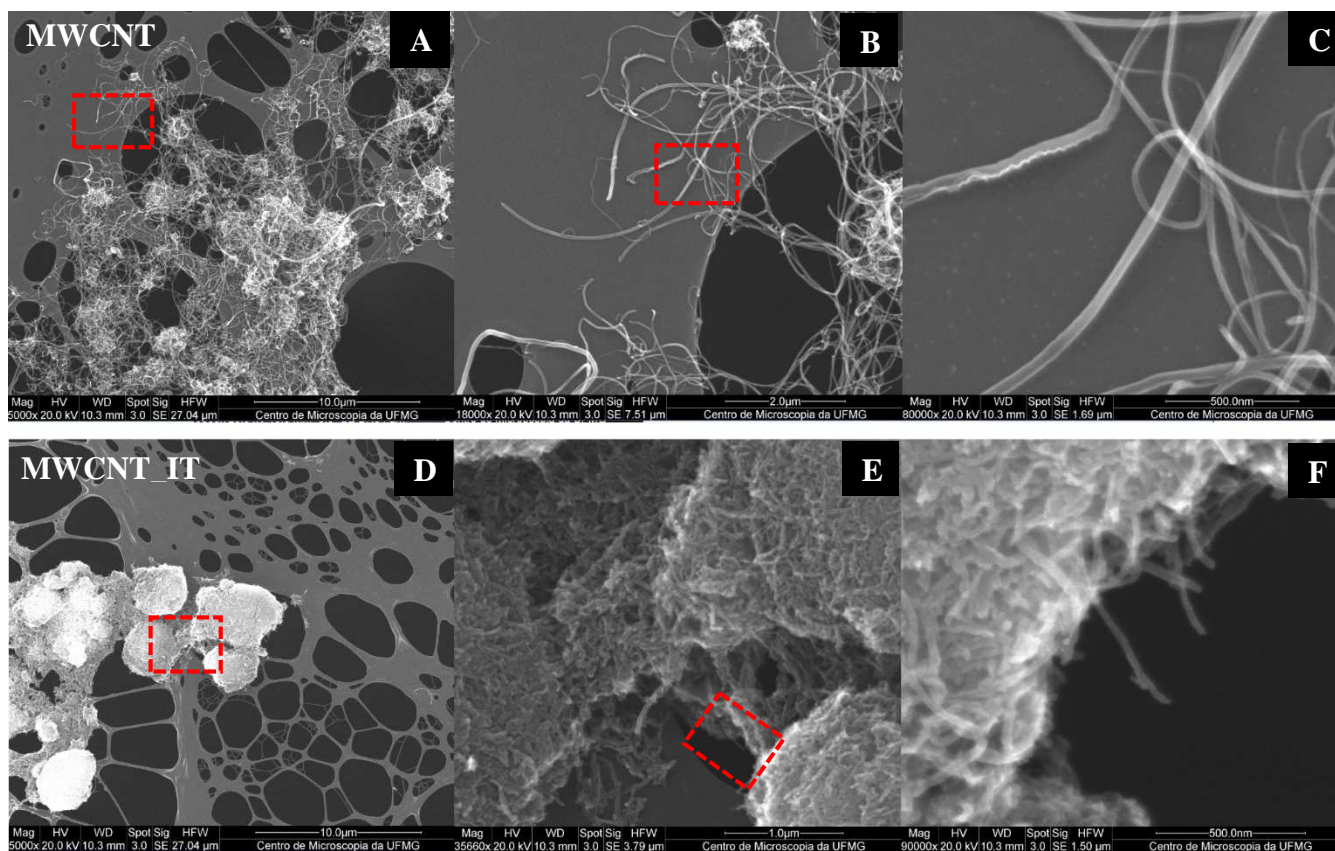


Figura 10 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão das amostras dos dois tipos de nanotubos de carbono não funcionalizados: MWCNT (A a C) e MWCNT_IT (D a F). A e D: visão geral das amostras. B e E: detalhe da visão geral em maior aumento salientando nanotubos em pequenos aglomerados. Note o menor tamanho nos NTC na imagem E. C e F: detalhe de nanotubos individualizados.

Observou-se que a amostra sintetizada pelo Departamento de Física, MWCTN, é bastante heterogênea, com relação ao comprimento e diâmetro dos tubos, enquanto que a amostra comprada, MWCTN_IT, possui maior homogeneidade, mas também maior agregação – visível na imagem de baixo, à esquerda, na forma de grandes agregados.

A intensa agregação da amostra foi também observada por MET. Com a Microscopia Eletrônica de Transmissão foi ainda possível verificar o diâmetro dos tubos, que varia entre 10 e 60nm. A variedade de diâmetros está destacada pelas setas na imagem à direita. A formação dos grumos dificulta a estimação do comprimento, mas foram observados nanotubos com mais de 50 μ m de comprimento.

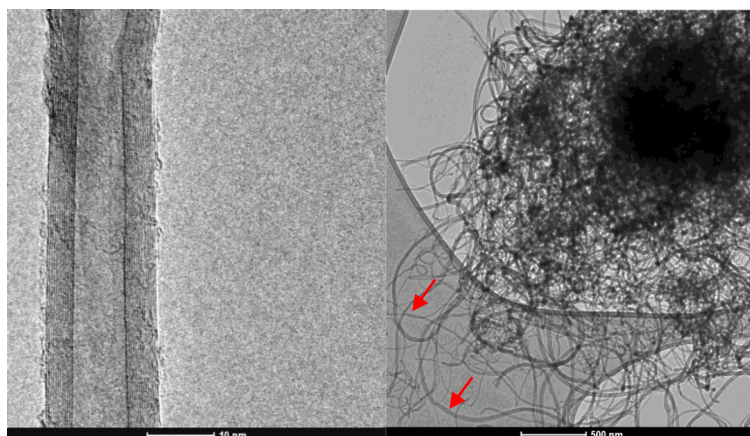


Figura 11 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão da amostra de MWCNT, não funcionalizado. À esquerda, o detalhe de um tubo mostrando as diversas paredes, e à direita, com as setas vermelhas destaca-se a diversidade de diâmetros dos tubos

Imagens MEV também foram feitas das amostras funcionalizadas (MWCNT-COOH e MWCNT-NH⁺³), exemplos mostrados na Figura 11, o que possibilitou confirmar que o tratamento ácido não destruiu a amostra, mas, como esperado é possível notar uma alteração no aspecto dos tubos, possivelmente devido à formação de quebras ou defeitos na superfície.

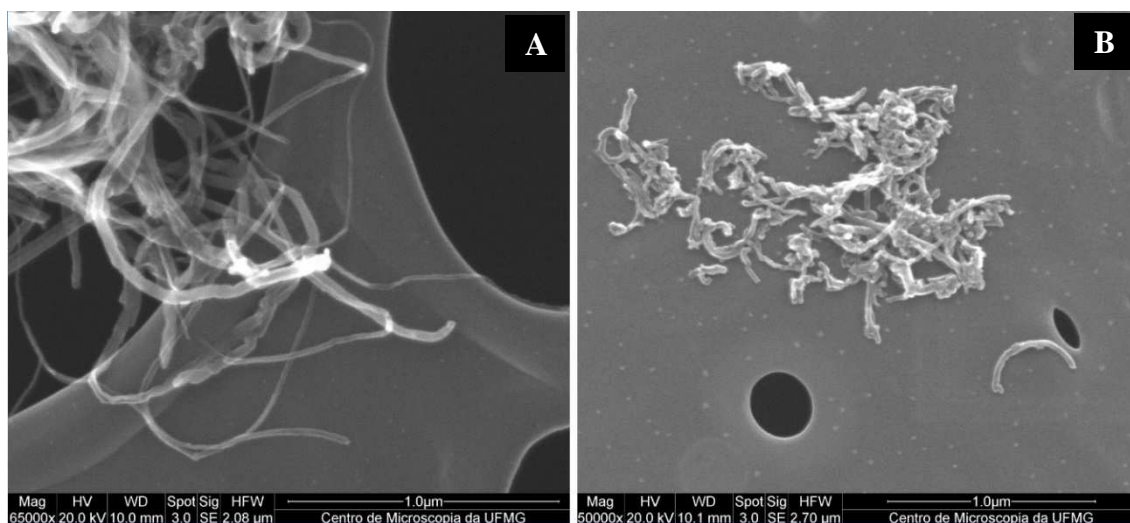


Figura 12 – Fotomicrografia eletrônica de varredura das amostras de nanotubos de carbono funcionalizados. Em A nanotubos do tipo MWCNT-COOH, e em B amostra MWCNT-NH⁺³ composta de nanotubos mais curtos e disformes, em comparação com A

A Espectroscopia Raman é uma das técnicas mais utilizadas na caracterização de materiais carbonosos, identificando os tipos de ligações e fornecendo informações sobre o grau de desordem da rede cristalina (Jorio et al, 2004). No caso dos NTCs ela possibilita a diferenciação entre nanotubos, carbono amorfo, e grafite.

O espectro Raman das amostras de MWCNT utilizadas mostra três regiões espectrais: a banda D (em torno de 1325 cm^{-1}) e G (em torno de 1580 cm^{-1}) – associadas à desordem estrutural da amostra – e a banda G' (em torno de 2660 cm^{-1}) relativa aos modos de vibração tangencial do grafite. Em linhas gerais, estes três picos representam o espectro típico de nanotubos de carbono.

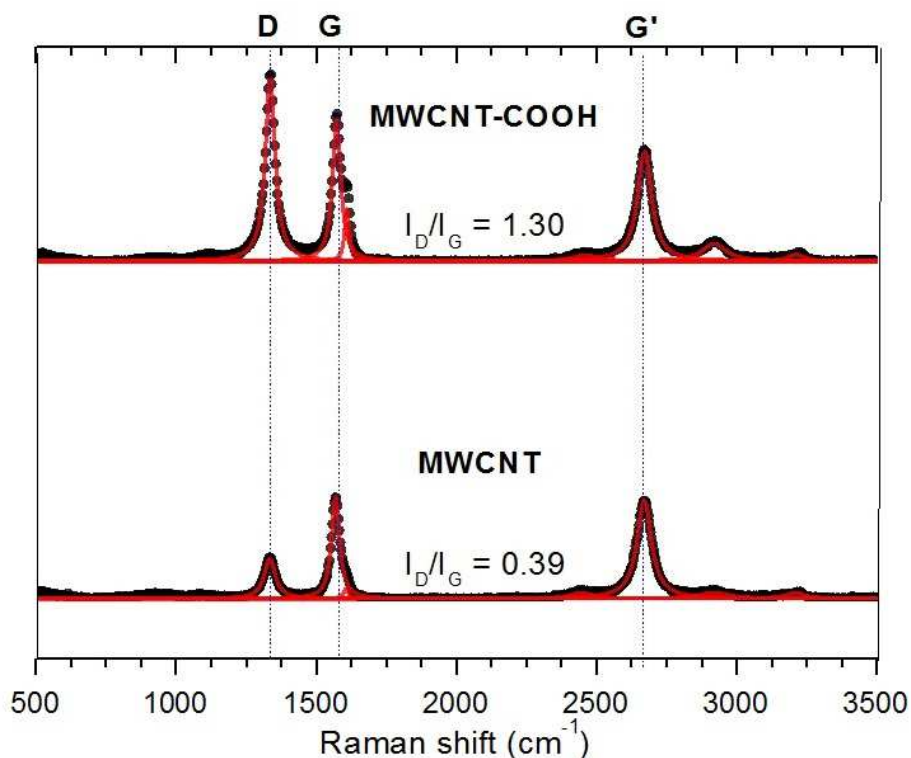


Figura 13 - Espectro Raman da amostra MWCNT não funcionalizada e funcionalizada MWCNT-COOH com presença das bandas D, G e G', e destaque para as diferenças da razão I_D/I_G das amostras

É possível observar o espectro típico de nanotubos de carbono nas duas amostras utilizadas para o estudo. Desta forma fica também demonstrado que o tratamento ácido realizado para a funcionalização dos tubos, não destruiu a amostra.

Também o grau de desordem na estrutura dos nanotubos de carbono pode ser estimado através do cálculo da razão entre as intensidades relativas das bandas D e G (I_D/I_G). Sendo que, quanto menor o valor da razão, maior o grau de grafitação e menor a concentração de defeitos estruturais nos tubos (carbonos sp³) (Santos, 2011). A distribuição da razão I_D/I_G das amostras sintetizadas e preparadas no Departamento de Física foi estudada, conforme ilustrado pela Figura 13.

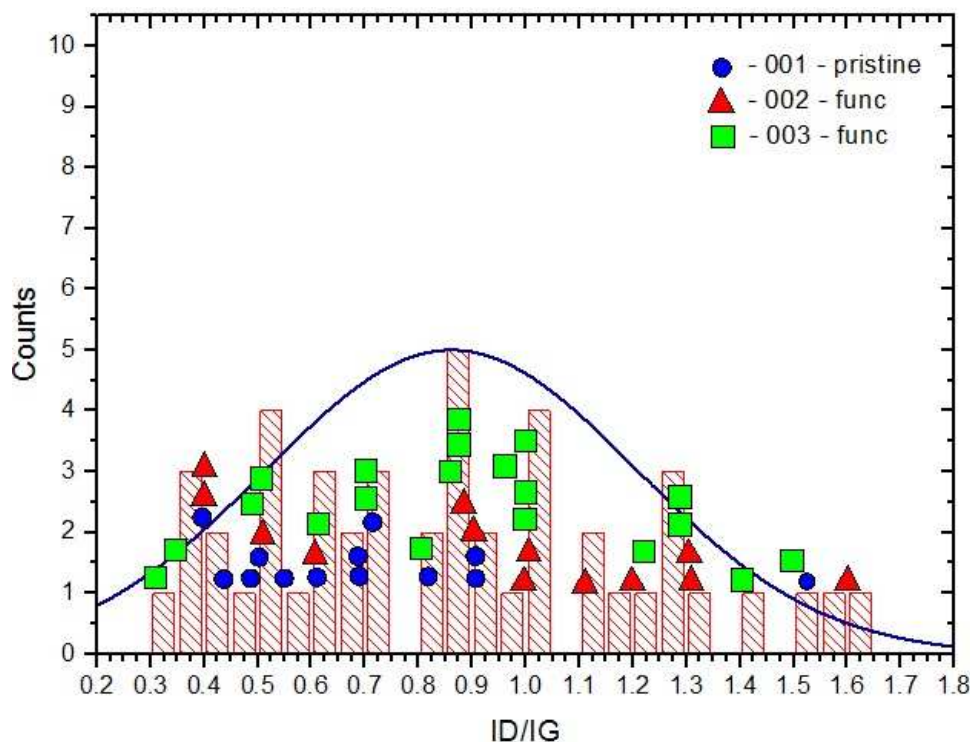


Figura 14 - Histograma ilustrando a abrangência de valores ID/IG obtidos para as amostras de nanotubos e a distribuição dos valores para cada amostra: não funcionalizada (001 - pristine) e funcionalizada (002 e 003 - func)

É possível observar que a amostra 001 de nanotubos não funcionalizados (*pristine*) apresenta valores de ID/G entre 0,4 e 0,9 e, as amostras 002 e 003 (*func*) que foram funcionalizadas apresentam os maiores valores (maior ID/IG igual a 1,6). Ainda, a maior abrangência da faixa de valores ID/IG (entre 0,3 e 1,6) para os nanotubos carboxilados sugere que este processo não se deu de forma homogênea na amostra, o que era esperado tendo em vista a conhecida heterogeneidade da amostra base (*as-grown*).

O aumento do valor de ID/IG também foi observado na análise Raman da outra amostra funcionalizada, MWCNT-NH⁺₃, em comparação com sua amostra base, MWCNT_IT. Isto demonstra que a funcionalização, em ambos casos, gerou defeitos nos tubos, como consequência da adição dos terminais carboxila e amino em sua superfície.

5.2 Calibração das câmaras de topo aberto

Os experimentos de calibração das câmaras possibilitaram a observação do alcance e do fluxo do ar dentro das CTAs e determinação da faixa de concentração a ser utilizada nos tratamentos com o aerossol seco. Confirmou-se a presença de um fluxo laminar na câmara de exposição da CTA, a partir do tubo de entrada de ar em direção ao topo da câmara. Vídeo gravado, utilizando um aerossol de cor branca, demonstrou maior concentração na região da câmara de exposição da CTA. A região de exposição das amostras mantém uma atmosfera mais densa, ou enriquecida, o que é ilustrado pela imagem esbranquiçada da Figura 15.

Testes com a armadilha desenvolvida (ímã de neodímio com fita autocolante para microscopia na superfície) possibilitaram a determinação da faixa de exposição. Foi possível detectar a presença de nanotubos no interior na câmara de exposição colocando-se o mínimo de 23mg de MWCNT na unidade de suspensão. A lavagem desta unidade com metanol e a recuperação de parte dos nanotubos depositados na base da CTA, possibilitou estimar a perda de nanotubos no sistema, devido ao depósito no interior do equipamento, em aproximadamente 20%.



Figura 15 - Experimentos para calibração da CTA. À esquerda, teste de alcance e distribuição com fumaça branca; à direita (acima) demonstração do magnetismo da amostra de MWCNT; à direita (abaixo) experimento de deposição para teste das armadilhas com ímãs

Apesar desta perda, as fitas autocolantes para microscopia colocadas para monitorar a exposição confirmaram o alcance e presença dos nanotubos em diversos pontos da CTA. Nanotubos de carbono foram observados nas fitas, localizadas ao lado das amostras de líquens, para todas as faixas de exposição, como pode-se observar na Figura 16. As fitas foram colocadas junto às amostras de líquens e algumas foram retiradas após um dia de exposição, e outras no dia da retirada das amostras (dia 7 após tratamento).

Em geral, uma maior quantidade de nanotubos foi observada nas fitas retiradas após os 7 dias de tratamento, e, em todas as amostras dos Tratamentos 2 e 3, em comparação com o Tratamento 1.

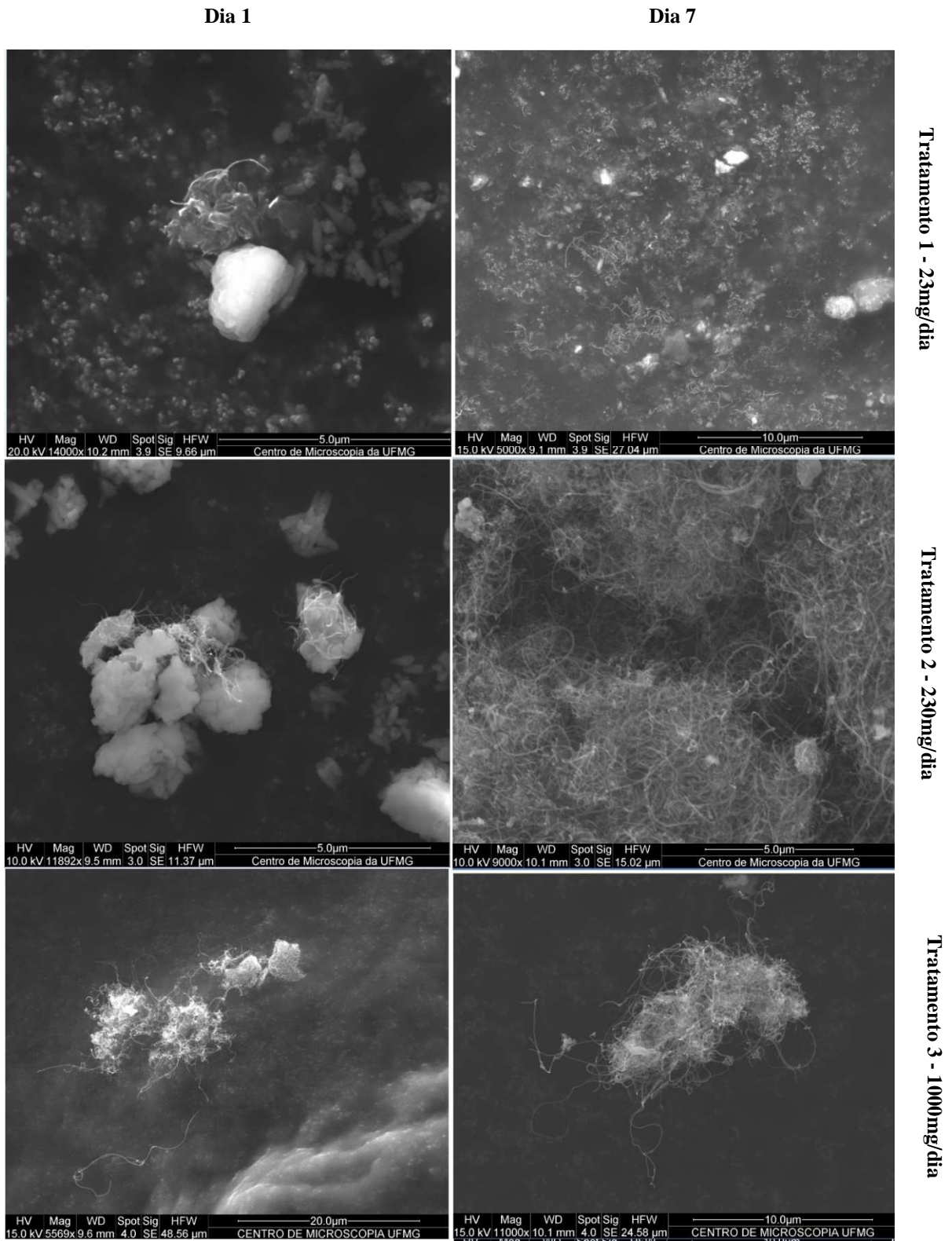


Figura 16 - Imagens MEV das fitas autocolantes de microscopia colocadas no interior da CTA para monitorar a exposição. As imagens da direita referem-se à um dia de exposição e as da esquerda à sete dias de exposição; as duas primeiras imagens (de cima para baixo), referem-se ao Tratamento 1, em seguida, o Tratamento 2 e 3.

5.3 *Parmotrema tinctorum*

Um total de 12 espécimes de *Parmotrema tinctorum* foi coletado nas dependências do Parque Nacional da Serra do Cipó (nas proximidades das coordenadas 19°15'317S e 44°33'217W). A ocorrência desta espécie nesta localidade ainda não havia sido reportada na literatura. Ainda não existem estudos sobre a composição da flora líquênica da Serra do Cipó. Tendo em vista este fato, foi elaborado projeto de pesquisa (disponível no capítulo “Anexos”) objetivando contribuir para o conhecimento da biodiversidade de líquens de Minas Gerais.

As nove amostras utilizadas nos experimentos tiveram o DNA extraído e sequenciado, e todas demonstraram 99% de similaridade com o isolado de *Parmotrema tinctorum* depositado no GenBank “gi|575526781|gb|KF129455.1”, confirmando a identificação morfológica. A ficha de caracterização para pré-identificação em campo mostrou-se eficiente na seleção dos espécimes a serem coletados.

5.4 Exposição do líquen, *Parmotrema tinctorum*, aos nanotubos de carbono

5.4.1 Estudos preliminares - vitalidade

A Figura 17 mostra gráfico contendo resultados dos experimentos preliminares onde o índice de vitalidade do fotobionte foi estimado após a exposição a diferentes dispersões de nanotubos de carbono, MWCNT-COOH. A vitalidade do fotobionte de *P. tinctorum* (também uma espécie de *Trebouxia*) foi reduzida com os tratamentos, sendo em torno de 225 o índice de vitalidade médio calculado para amostras controle e 150 para as tratadas com 100 µg/mL de MWCNT-COOH.

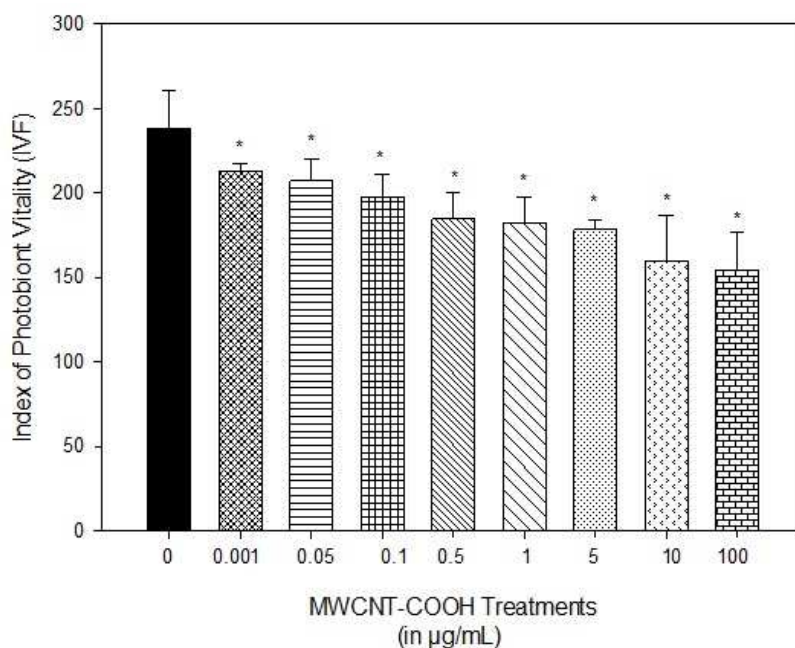


Figura 17 - Efeitos do tratamento com MWCNT-COOH (concentração entre 0,001 e 100µg/mL) no índice de vitalidade do fotobionte (IVF). (média ± desvio padrão, *estatisticamente diferente do controle)

Diferenças significativas ($p \leq 0,02$) nos valores de IVF foram encontradas comparando tratamentos e controle. Apesar disto, um efeito dose-resposta não pôde ser observado claramente: a comparação entre tratamentos é significativa ($p \leq 0,05$) quando a concentração aumenta um fator de 100. Não há diferenças significativas na vitalidade aumentando-se de 0,001 para 0,05 µg/mL, de 0,1 para 5 µg/mL ou de 10 para 100 µg/mL a concentração de nanotubos do tratamento.

Estes dados estão de acordo com estudo similar sobre o efeito de NTCs na vitalidade de uma espécie de alga (Pereira et al, 2014), onde a vitalidade foi também alterada, mas não de forma dose dependente.

Entretanto, a diminuição da vitalidade aqui observada é informação importante, por indicar a alteração do organismo devido à exposição.

5.4.2 Bioacumulação/Internalização

O mesmo tratamento utilizado para a análise da vitalidade foi realizado para o estudo da bioacumulação. A Fig. 18 mostra os resultados obtidos por Espectroscopia Raman, relacionando o espectro e a localização onde este foi obtido na célula do fotobionte. A imagem refere-se a amostra tratada com 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOH.

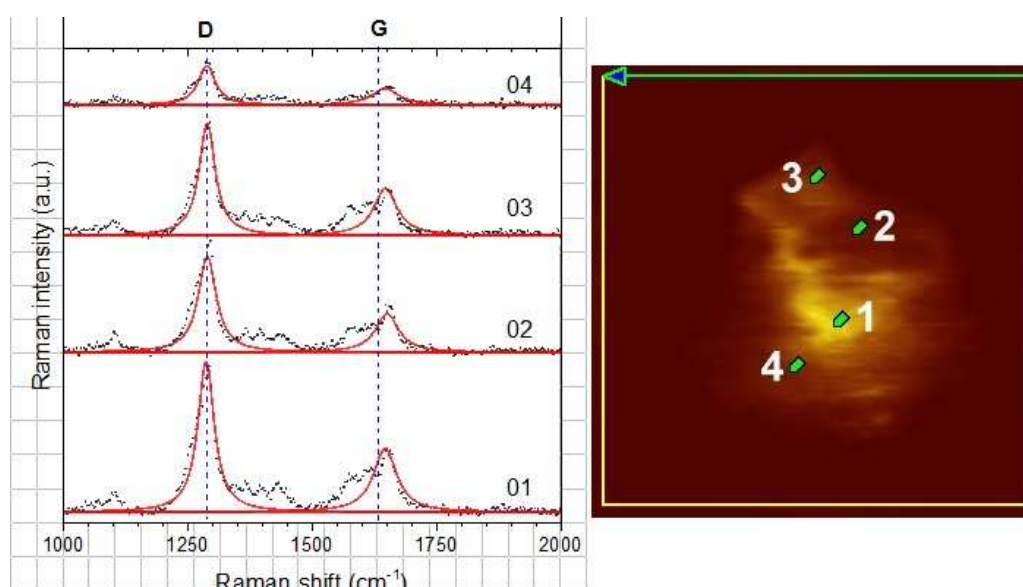


Figura 18 - Espectros Raman, à esquerda, e imagem de Microscopia Confocal Raman, à direita, demonstrando a localização de obtenção dos picos característicos dos MWCNT na célula da alga. À direita, a imagem da célula da alga e os quatro pontos onde foram obtidos os espectros mostrados à esquerda.

Foi possível observar o sinal Raman característicos dos nanotubos na região da célula da alga, através da detecção das bandas D ($\sim 1295\text{cm}^{-1}$) e G ($\sim 1653\text{ cm}^{-1}$). As amostras controle não tiveram picos similares nesta região do espectro, e pontos fora da célula também não. Este resultado está de acordo com o trabalho de Khodakovskaya e colaboradores (2012) onde a presença e intensidade relativa da banda G foi associada à presença de MWCNT dentro de células vegetais.

Vale comentar que a presença de um pico em 680nm advindo da fluorescência da clorofila foi um dificultador destas análises, sendo necessário, por diversas vezes, repetir e adequar o equipamento para as leituras.

Adicionalmente, após o período de exposição dentro da CTA com o aerossol seco de MWCNT, a superfície do líquen e o raspado do córtex foram também observados ao microscópio eletrônico de varredura (Figura 19) a fim de confirmar a deposição e

capacidade de internalização dos nanotubos para o interior do líquen, alcançando a camada de fotobionte.

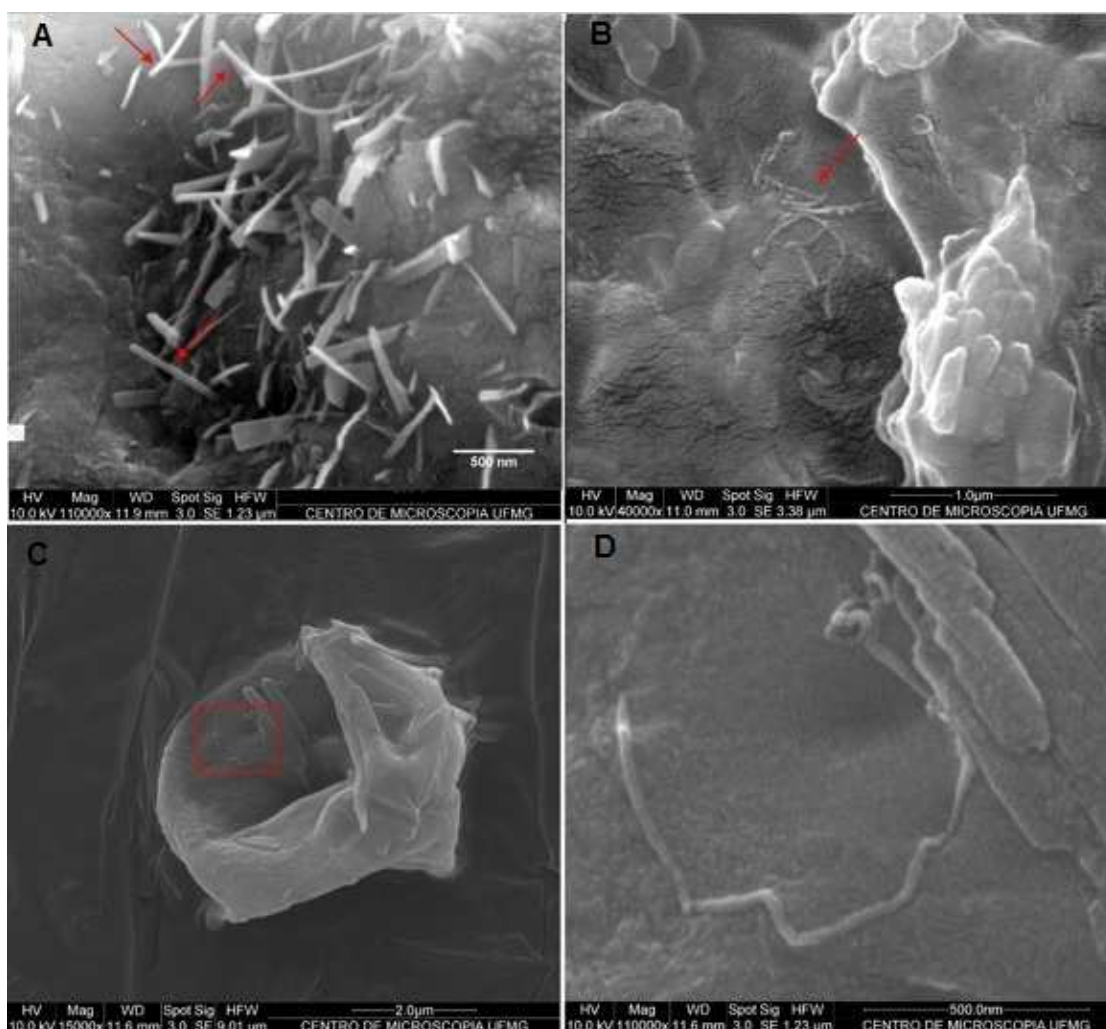


Figura 19 - Fotomicrografia MEV de nanotubos de carbono (setas em vermelho) na superfície do líquen. Em (A) superfície do talo após a exposição à MWCNT com o aerossol seco, (B) MWCNT-COOH disperso em água, em (C) detalhe da célula do fotobionte raspado do córtex do líquen e em (D) detalhe (área do quadrado da imagem C) do nanotubo de carbono observado da superfície na célula. As setas apontam para os nanotubos de carbono

Como mostrado na Figura 19 (A), foi possível observar nanotubos de carbono presos à superfície do talo, confirmando que a exposição ao aerossol seco foi efetiva, resultando na deposição dos NTCs. Em B (Fig. 19) é possível notar a agregação dos nanotubos no talo após a exposição aos MWCNT-COOH dispersos em água e em C e D a imagem da célula do fotobionte com um nanotubo de carbono na superfície, após a raspagem do córtex.

Vários estudos (Nieboer e Richardson, 1981; Brown e Brown, 1991; Nash, 2008) sugerem que os líquens são bio sistemas efetivos para a retenção de material particulado,

principalmente devido à presença de considerável espaço entre as células do fungo e as da alga (Paoli et al, 2014; Viana et al, 2011). Além deste fato, a retenção dos NTCs em *P. tinctorum* pode ser devida à composição química da superfície do talo, que possui, como relatado por Oliveira e colaboradores (2009), grandes quantidades de agentes quelantes, como atranorina e ácido lecanórico. Os cristais destes ácidos foram visualizados nas amostras expostas (cristais visíveis nas imagens da Fig. 19).

Ao que tudo indica, os nanotubos de carbono disponibilizados na forma de aerossol seco foram retidos no talo, sendo possível sua internalização. Já os nanotubos (funcionalizados) disponibilizados dispersos em água foram observados em camadas internas do talo, na superfície da célula da alga. A internalização das nanopartículas pelas células fúngicas ou do fotobionte de *P. tinctorum* não foi analisada neste trabalho. No entanto, a capacidade de internalização de nanotubos em células vegetais já foi descrita (Liu et al, 2009; Khodakovskaya et al, 2012) e estudo utilizando esta mesma amostra de nanotubos de carbono como carreadores de sequências gênicas específicas para a inibição da formação de estruturas fúngicas demonstra, indiretamente, a internalização por células fúngicas (Rodrigues, 2009).

5.4.3 Fotossíntese

Em ambos experimentos, com MWCNT como aerossol seco (gráfico A da Figura 20) e com MWCNT-COOH disperso em água (gráfico B da Figura 20), nenhuma diferença na eficiência fotossintética de *P. tinctorum* foi observada, sendo que os valores de F_v/F_m variaram de 0,525 a 0,638.

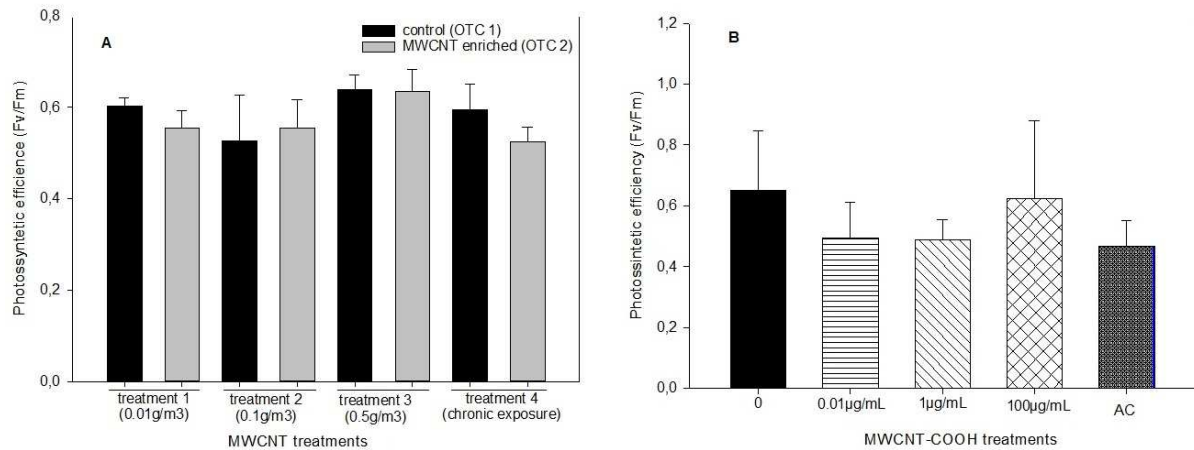


Figura 20 - Efeitos da exposição à nanotubos de carbono na eficiência fotossintética de *Parmotrema tinctorum* (média \pm desvio padrão, n=6). Em (A) resultados do tratamento à MWCNT e em (B) à MWCNT-COOH

Estudos com outros organismos fotossintetizantes, relataram que a exposição à nanotubos de carbono pode influenciar o rendimento quântico do fotossistema II (dado por Fv/Fm), devido ao efeito de escurecimento causado pela deposição de nanotubos na superfície (Schwab et al, 2011; Pereira et al, 2014). Embora a deposição dos nanotubos de carbono na superfície de *P. tinctorum* tenha sido observada, em nosso estudo, a eficiência fotossintética não foi alterada. Provavelmente, como nosso desenho experimental objetivou um cenário de exposição mais dinâmico e realista, a deposição de nanotubos não foi em quantidade suficiente para causar um efeito de sombreamento do talo.

5.4.4 Dano de membrana

A membrana do líquen não teve sua permeabilidade alterada após 7 e/ou 21 dias de exposição à MWCNT, como mostrado no gráfico A da Figura 21. Apesar de nenhuma diferença estatística ter sido observada entre tratamentos e controles, as amostras expostas por 21 dias ininterruptos (“chronic exposure”) apresentaram os maiores valores de condutividade. Isso pode ser devido à um efeito de estresse da técnica transplante, como reportado por Tretiach e colaboradores (2009), já que foi observado também nas amostras controle.

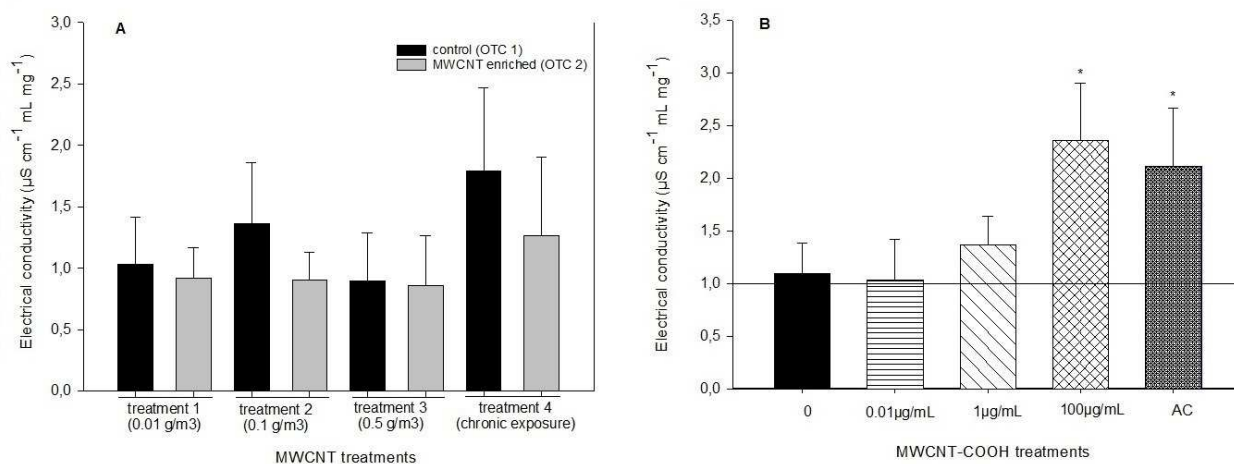


Figura 21 - Efeitos da exposição à nanotubos de carbono na permeabilidade da membrana de *Parmotrema tinctorum*, expresso como condutividade elétrica média \pm desvio padrão, n=6). Em (A) após a exposição à MWCNT e em (B) à MWCNT-COOH (*, estatisticamente diferente do controle)

Com relação à exposição a MWCNT-COOH (Figura 21, B), houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) comparando amostras controle com amostras expostas à 100 µg/mL de nanotubos de carbono e à 100 µg/mL de carvão ativado (controle positivo). Neste caso, embora os tratamentos não apresentem diferenças significativas entre si, a condutividade elétrica aumenta numa relação direta com a concentração de nanotubos de carbono funcionalizados presentes na dispersão.

A comparação direta entre os gráficos A e B da figura não pode ser realizada tendo em vista as diferenças experimentais presentes. Entretanto, sabendo que os líquens são organismos poiquilohídricos, onde a disponibilidade de água está diretamente relacionada ao seu metabolismo (Honegger, 1991; Kosugi et al, 2009; Tretiach et al, 2012), é possível levantar a hipótese que o tratamento com nanotubos de carbono dispersos em água pode resultar na ativação do metabolismo do líquen.

Quando da hidratação do talo, Beckett e colaboradores (1996), estudando *P. tinctorum*, demonstraram que aproximadamente 20% da água é encontrada nos espaços intercelulares, e 5% nos poros da parede celular (5-10nm). Considerando este padrão de distribuição, a aspersão das amostras com nanotubos em água pode possibilitar um acesso facilitado dos NTCs aos espaços intercelulares do talo. A acumulação deste nanomaterial nestes espaços associada à resultante ativação do metabolismo pela água, pode ter resultado em danos à membrana celular (nas amostras expostas à MWCNT-COOH).

5.4.5 Análise elementar

A análise elementar dos diferentes extratos celulares mostrou alterações na localização de alguns elementos após a exposição aos nanotubos de carbono, significando que a dinâmica do ciclo mineral (conforme descrito em Brown e Brown, 1991) foi alterado pelos tratamentos com MWCNT-COOH.

A Tabela 2 mostra as concentrações dos elementos cálcio, cobalto, magnésio, manganês e zinco nos extratos intracelular e extracelular/parede celular. Cálcio e magnésio apresentaram um padrão de distribuição diferente comparando tratamentos e controle. Nenhuma alteração na localização de Co^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} foi verificada.

Tabela 2 - Distribuição de elementos químicos em *Parmotrema tinctorum* após tratamentos com MWCNT-COOH, expresso como valores médios (em mg/mL peso seco)

ELEM	0		0.01		1		100		AC	
	Wall bound	Intracellular	Wall bound	Intracellular	Wall bound	Intracellular	Wall bound	Intracellular	Wall bound	Intracellular
ENT										
CA ²⁺	0.15	3.28	0.76	0.34	0.52	0.21	0.73	0.43	0.03	0.21
CO ²⁺	0.01	<0.1	0.02	<0.1	0.02	<0.1	0.02	<0.1	0.02	<0.1
MG ²⁺	0.05	0.21	0.06	0.13	0.07	0.11	0.07	0.11	0.06	0.10
MN ²⁺	0.03	<0.1	0.04	<0.1	0.03	<0.1	0.03	<0.1	0.02	<0.1
ZN ²⁺	0.13	0.06	0.12	0.03	0.12	0.03	0.15	0.06	0.17	0.03

Sobre o extrato intercelular (fração aquosa das lavagens), a concentração elementar foi inferior ao limite de detecção da técnica (igual a 0,1mg/mL para todos os elementos). O uso de outro método analítico para a quantificação elementar deve ser considerado para análises futuras.

De acordo com nossos resultados, a localização de Ca^{+2} e Mg^{+2} dentro da célula foi alterada em todos os tratamentos com MWCNT-COOH. Estes íons costumam ser procedentes da água de chuva, e dentro do talo, possuem função estabilizadora e de estrutura celular, ocupando locais de intercambio iônico, ligados à parede celular e ao interior da membrana plasmática, (Brown e Beckett, 1984; Brown e Brown, 1991). A alteração das condições ambientais conduz à modificação da composição elementar quando estão disponíveis cátions com maior afinidade ou em concentração suficientemente elevada para deslocar o cátion original. Os íons de fronteira, como Ca^{+2} e Mg^{+2} , conforme descrito em Nieboer e Richardson, 1980, são elementos mais propensos a induzirem trocas na estrutura da membrana.

Nieboer et al (1979) e Sarret et al (1998) forneceram dados apontando que o ácido carboxílico e hidroxilo são grupos funcionais que atuam como intercambiadores de cátions na célula. Ou seja, os cátions ficam ligados à estes grupos nos locais de intercâmbio iônico; e por alterações das condições ambientais acontece a troca do cátion (ou íon de fronteira) por outro – o que possivelmente explica as modificações nas concentrações de Ca^{+2} e Mg^{+2} observados após o tratamento com NTCs funcionalizados.

A compreensão deste mecanismo nos permite supor que a exposição à MWCNT-COOH modificou a composição dos locais de intercâmbio iônico (parede celular e interior da membrana), retirando o Ca^{+2} e Mg^{+2} destes sítios. A presença, em grandes proporções, dos grupos carboxila e hidroxila na superfície dos tubos pode ter atuado como “concorrente” aos grupos presentes na parede celular.

Estes resultados são, portanto, condizentes com aqueles descritos sobre os danos de membrana, suportando a hipótese de que a permeabilidade da membrana foi alterada devido à exposição à NTCs o que permitiu a translocação de íons, antes localizados no interior da célula para o seu exterior.

Considerando que nosso principal objetivo é avaliar o potencial uso de líquens como biomonitores, a sensibilidade deste organismo à exposição é uma questão essencial. Particularmente, *Parmotrema tinctorum* é um líquen conhecido por sua sensibilidade à diversos poluentes (Ohmura et al, 2009), característica relacionada à sua natureza foliosa – onde todo córtex superior está disponível para a absorção de poluentes e sua acumulação (Kaffer et al, 2012). As alterações da vitalidade e os danos de membrana aqui descritos são resultados que demonstram a sensibilidade desta espécie à exposição à nanotubos de carbono.

A efetiva internalização dos MWCNT nas células do líquen, à relação entre a concentração exposta e à capacidade de internalização, e interação celular destas nanopartículas foram observadas. Ainda, o conhecimento da heterogeneidade da amostra de MWCNT utilizada, em termos de diâmetro, e principalmente, comprimento, conforme demonstram os resultados de caracterização, intensifica os questionamentos relacionados à forma e dose efetivamente internalizada pelas células.

Os resultados aqui descritos, demonstram a habilidade de *P. tinctorum* em reter e internalizar (alcançando a camada de células do fotobionte) esta nanopartícula num cenário realista de exposição.

Nosso estudo é o primeiro à reportar a sensibilidade desta espécie à uma nanopartícula. No entanto, não foi observado efeito dose-reposta na maior parte dos resultados, e o limite de detecção do método não pôde ser determinado. A relação entre toxicidade e concentração de nanotubos de carbono, para Bandaru e Firme (2010), sugere um limite distinto entre baixa e alta toxicidade quando uma concentração específica é alcançada, dependendo do tipo celular estudado. A possibilidade de regeneração pós-exposição é também comentada pelos autores. Em nosso estudo, apesar de obtermos resultados demonstrando alteração na vitalidade, a eficiência da fotossíntese, por exemplo, não foi alterada. Parece essencial a compreensão dos mecanismos de interação celular, do tempo de resposta e da possibilidade de regeneração celular, para a melhor compreensão do efetivo potencial tóxico destas nanopartículas.

5.5 Exposição do fotobionte isolado, *Trebouxia sp*, aos nanotubos de carbono

5.5.1 Crescimento da cultura e quantificação da clorofila

Os efeitos da exposição aos nanotubos de carbono no crescimento da cultura do fotobionte foi inicialmente verificado através do registro fotográfico semanal das culturas. Na Figura 22, como exemplo, é possível observar os discos com o crescimento das algas na primeira e segunda semanas após inoculação. Cada disco, de A a E na figura, corresponde à uma condição de exposição. Foi possível observar um maior crescimento nos discos D e C comparando com A e B durante todo o período de crescimento. Este padrão foi verificado em todas as replicatas (6 x 3) e na repetição do experimento partindo de outra população de algas.

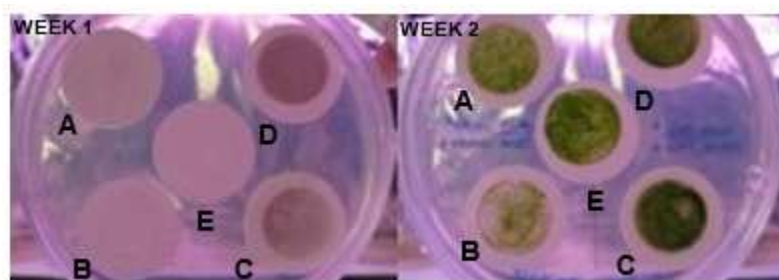


Figura 22 - Diferenças no crescimento da cultura de *Trebouxia sp* após exposição à 100µg/mL de MWCNT-NH³; à esquerda placa na primeira semana e à direita na segunda semana após inoculação. Discos A e B: células re-suspendidas na dispersão de nanotubos antes da inoculação (A, disco de sílica, e B, de acetato). Discos C e D: células inoculadas nos discos contendo nanotubos na superfície (sendo C, disco de sílica e D de acetato). E: cultura controle no disco de acetato

A quantificação da clorofila, neste caso, uma medida indireta da biomassa, foi realizada após 21 dias de crescimento. Apesar de demonstrar variações, apenas o tratamento com 0,01µg/mL demonstrou ser estatisticamente diferente do controle ($p \leq 0,05$), como ilustra o gráfico da Figura 23.

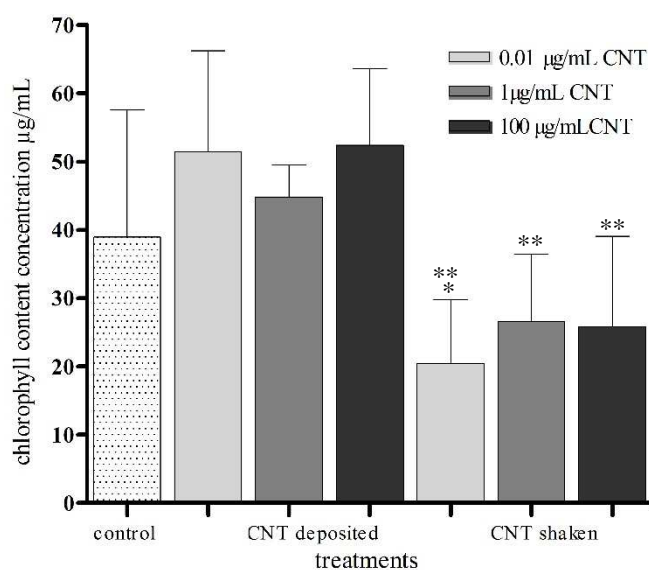


Figura 23 - Efeito da exposição à nanotubos de carbono na quantidade de clorofila de *Trebouxia sp* para ambos tipos de exposição (MWCNT-NH⁺³ re-suspendidos e depositados) e faixa de concentração (*, estatisticamente diferente do controle; ** estatisticamente diferente com similares do outro tratamento)

A concentração de clorofila do grupo tratado com re-suspensão (*CNT shaken*) foi estatisticamente ($p \leq 0,01$) diferente do grupo onde os nanotubos foram depositados (*CNT deposited*) no disco. Ou seja, o crescimento foi alterado quando as células do fotobionte foram re-suspendidas direto na dispersão de MWCNT-NH⁺³, antes de serem inoculadas no disco. Este padrão se repetiu alterando o tipo de disco (de sílica ou acetato), e a população inoculada (segundo *set*). Entretanto, a exposição não influenciou a quantidade de clorofila de forma dose-dependente.

5.5.2 Eficiência da fotossíntese

A atividade fotossintética não foi alterada de forma significativa por nenhum tratamento, como ilustrado pelo gráfico da Figura 24.

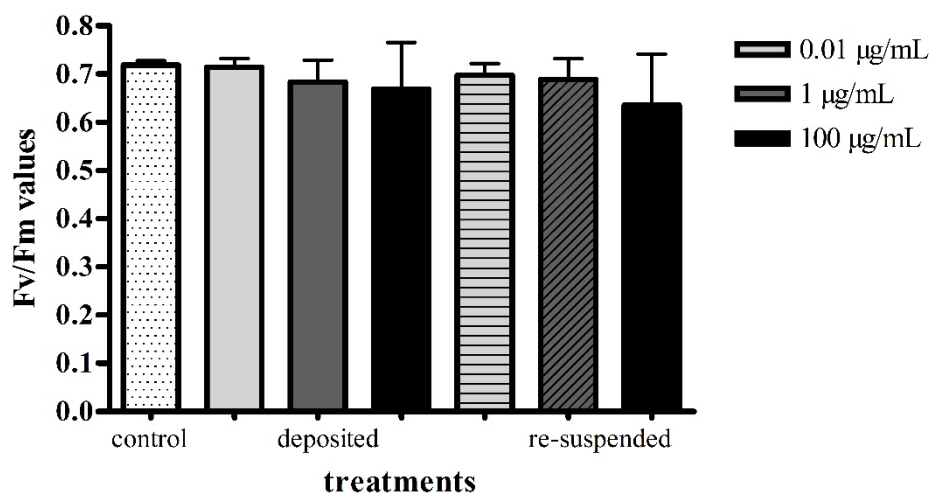


Figura 24 - Efeitos da exposição à nanotubos de carbono na eficiência fotossintética de *Trebouxia* sp para ambos tipos de exposição (MWCNT-NH³⁺ re-suspensos e depositados) e faixa de concentração

Nenhuma diferença estatística foram encontradas nos valores de Fv/Fm comparando tratamento e controle, sendo o valor médio de 0,716 para as amostras controle e 0,650 para o tratamento de maior concentração (re-suspensão). Estes valores são condizentes com outros estudos relacionados à células de *Trebouxia* (Tretiach et al, 2012) com atividade fotossintética normal. Embora no outro tipo de exposição, grandes quantidades de nanotubos foram depositados formando uma área cinza no disco onde se deu o crescimento celular, nenhuma alteração no aparato fotossintético foi observada.

5.5.3 Dano de membrana

Células coradas com Sytox Green e observadas por microscopia confocal demonstraram dano celular em ambos tipos de exposição. A Figura 25 mostra imagens de todos os tipos de exposição e concentração.

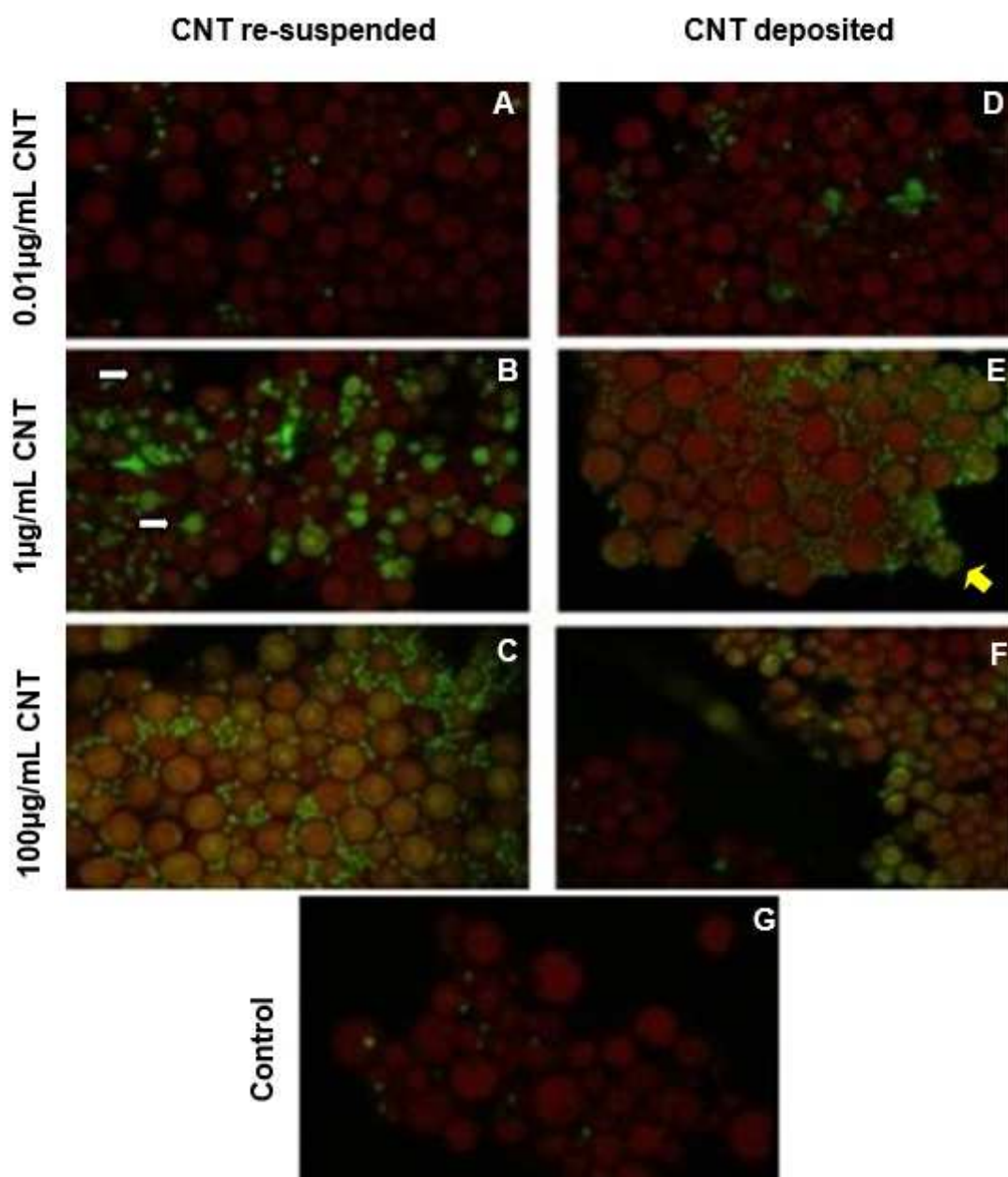


Figura 25 - Microfotografia confocal de células *Trebouxia* coradas com Sytox Green e observadas após 21 dias de tratamento com 0,01μg/mL (A, D), 1μg/mL (B, E), 100μg/mL (C, F) de MWCNT-NH₃+3 e controle (G). Setas brancas, autósporos, e setas amarelas, célula mãe com autósporos

Sabendo que as células com a membrana danificada coram-se de verde, na Figura é possível notar que a exposição à 0,01μg/mL (imagens A e D) teve resultado semelhante ao controle, e que nas maiores concentrações (imagens B, C e E, F) mais células internalizaram o corante. As diferenças entre os tipos de exposição - NTC depositado e re-suspendido – não são claras, no entanto, variações com relação ao estágio de desenvolvimento das células danificadas foram observadas em toda amostra analisada. As células menores (autósporos) e a célula-mãe (setas indicativas nas imagens B e E, respectivamente) apareceram em todas as amostras como tipos celulares mais

danificados. Isso pode ser devido às diferenças na espessura da parede celular, pois as camadas que constituem a parede celular de *Trebouxia* não estão completas nos autósporos e prestes a se romperem (para liberar os autósporos) na célula-mãe (conforme descrito por Peveling e Konig, 1985). Desta forma, estes estágios de desenvolvimento podem ser mais sensíveis à exposição. Ainda, foi possível notar sempre a presença de células saudáveis entre as células danificadas. Isso é claro na imagem F onde em um lado temos células verdes (danificadas) e no outro, células vermelhas (saudáveis), mas este padrão foi observado em todas as amostras onde células danificadas foram detectadas. Ao que parece, o ciclo de vida de *Trebouxia* não foi severamente alterado, não descontinuando a dinâmica de desenvolvimento da população.

5.5.4 Biaculumação em *Trebouxia*

Os estudos de bioacumulação - desta vez realizados através do uso da amostra de MWCNT funcionalizada com FITC - resultaram em diversas imagens. Todas as imagens tiveram o mesmo tratamento e são referentes à fração intracelular. Isto porque a microscopia confocal varre a amostra em profundidade, sendo possível, no tratamento das imagens, escolher as camadas de interesse. No entanto, a emissão esperada em 517nm foi de difícil observação. A presença de autofluorescência na região próxima a 600nm dificultou a observação em diversas amostras, principalmente nas de 24h de exposição.

A emissão do MWCNT-FITC foi observada e com mais intensidade nas células menores (autósporos) e na célula mãe, conforme demonstra a Fig. 26, abaixo.

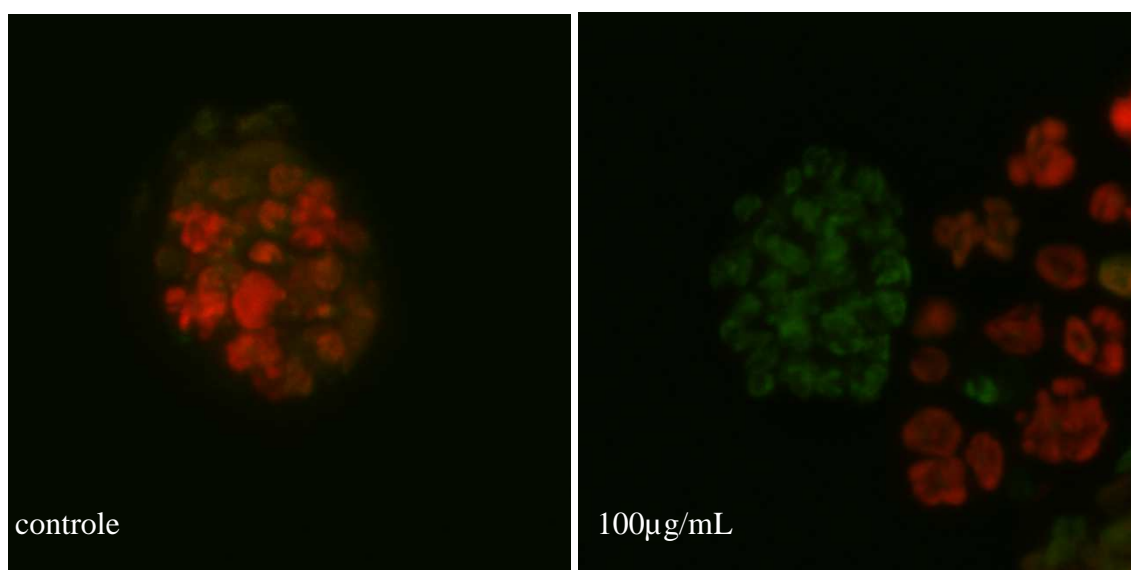


Figura 26 - Células de *Trebouxia* sp expostas por 24h a 100µg/mL de MWCNT-FITC. À esquerda, célula mãe do controle tratado com água e à direita células tratadas com MWCNT. A cor vermelha indica a emissão da clorofila a e o verde da amostra de nanotubos de carbono

Após a observação de diversas amostras notou-se que devido às aparentes diferenças de bioacumulação entre os estágios de desenvolvimento celular - provavelmente relacionadas às diferenças na formação da parede celular - é essencial a comparação entre células do mesmo tipo. Isso porque, o comportamento das células é diferente, como é possível observar na imagem da direita, com células vermelhas (emissão apenas da clorofila) e células esverdeadas (emissão do MWCNT-FITC e da clorofila). A amostra nunca mostrou-se homogênea, sendo sempre possível observar células verdes e vermelhas.

Células tratadas com a menor concentração de MWCNT-FITC (0,01 μ g/mL) também demonstraram emissão verde, conforme demonstra a Fig. 27.

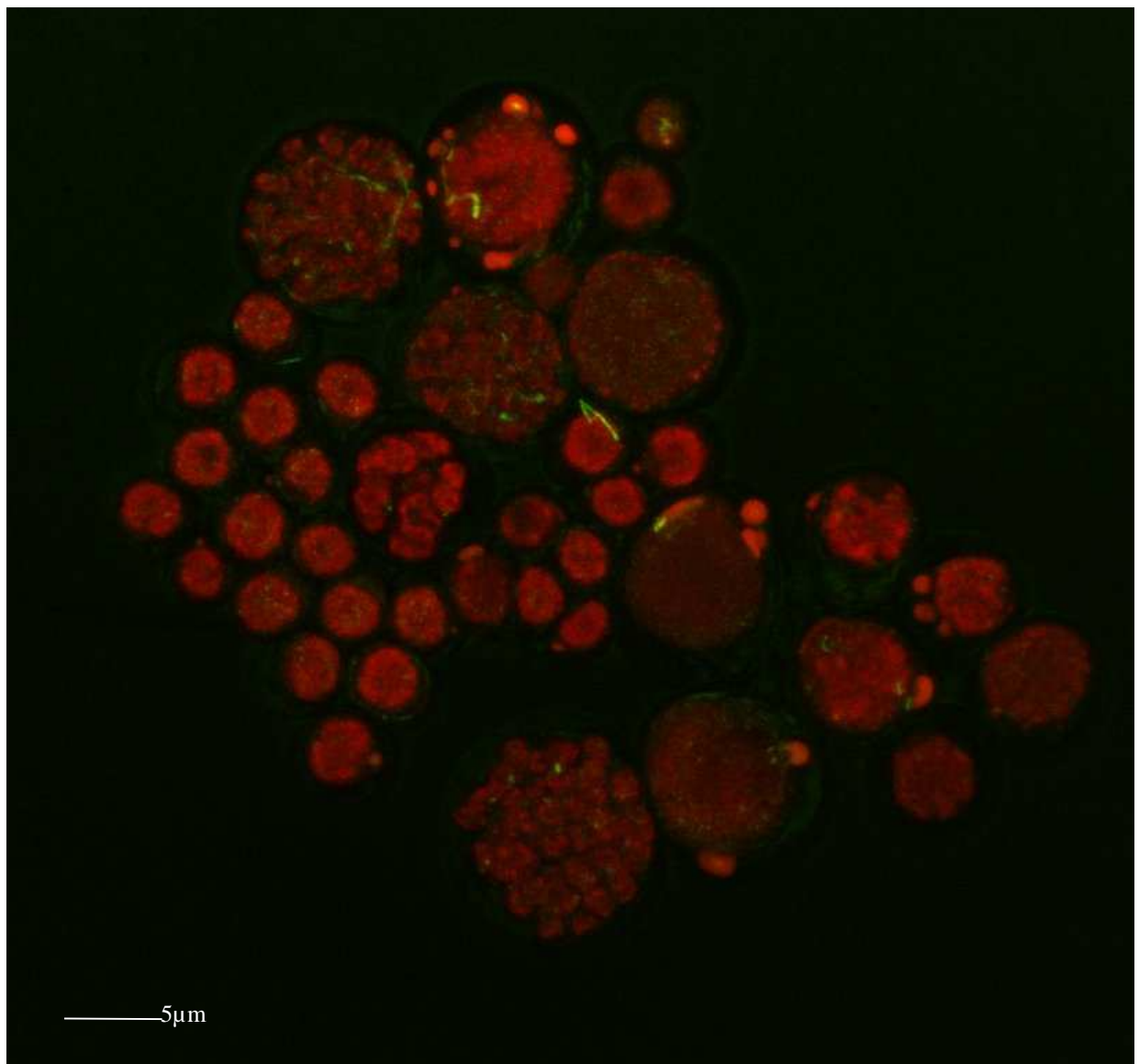


Figura 27 - Células de *Trebouxia* sp, em diversos estágios de desenvolvimento, tratadas com 0,01 μ g/mL de MWCNT-FITC por 1h. Cor vermelha indica a emissão da clorofila a e a verde da amostra de nanotubos de carbono fluorescentes

Apesar de ter sido possível observar a emissão do nanotubo marcado em algumas amostras, não foi possível detectar um efeito dose-resposta, ou inferir sobre o efeito do tempo de exposição na bioacumulação. Apesar da confirmação da emissão da amostra de MWCNT-FITC em 517nm e realização de diversos experimentos, a análise por microscopia confocal dos nanotubos marcados com FITC não se mostrou adequada ao estudo da bioacumulação em *Trebouxia* sp, sendo os resultados pouco conclusivos.

Os resultados obtidos com o estudo do fotobionte isolado foram condizentes com os para o líquen *P. tinctorum*, onde, também, danos de membrana foram observados, mas, nenhuma alteração da eficiência fotossíntese. Também não foram observados efeitos dose-resposta nos experimentos.

Uma das diferenças com relação à exposição dos líquens é relacionada à possibilidade de acompanhar o desenvolvimento da população em um curto período de tempo, o que possibilitou inferir sobre alterações no crescimento, e à observação das diferenças de efeitos para tipos celulares diferentes. É possível supor diferenças de respostas entre as células inoculadas que iniciaram o crescimento, e as derivadas destas. Ou seja, após 21 dias, as células mais danificadas estariam na camada em contato com o disco, e as superiores seriam as menos danificadas. Como consequência, como a análise da eficiência da fotossíntese é realizada no disco íntegro, sem alteração desta disposição, pode ter havido maior contribuição das células localizadas nas camadas superiores na emissão da fluorescência medida pelo equipamento.

Para análises futuras seria interessante contemplar uma medida quantitativa de dano de membrana, o estudo dos efeitos em diferentes períodos de exposição (partindo do inóculo), além do estudo de estágios de desenvolvimento celulares específicos.

6 Conclusões

O estudo dos efeitos dos nanotubos de carbono funcionalizados e não funcionalizados realizados permitem observar que o potencial tóxico dos MWCNT pode estar relacionado à forma de interação destas nanopartículas com o organismo em questão. Observamos que os organismos estudados, o fungo liqueinizado e a alga isolada, foram sensíveis aos tratamentos, mas nenhum efeito tóxico pode ser mencionado, nenhum dano severo ou evento de mortalidade.

Ainda as indicações de efeitos sobre o crescimento na cultura de células do fotobionte, permite extrapolações sobre a possibilidade de um maior efeito negativo na borda do líquen (onde estão as células mais jovens, em crescimento) e/ou sobre estudos relacionados à liquenometria, o que pode ser futuramente monitorado.

O desenvolvimento de protocolos de mensuração e detecção ambiental de nanopartículas é um dos maiores desafios atuais na área de nanoecotoxicologia, e um limitador do alcance de nossas conclusões. No entanto, nossos resultados apontam para a possibilidade de uso dos fungos liqueinizados como organismos-modelo a serem considerados num contexto de avaliação de risco ambiental de nanopartículas.

Estudos futuros podem contemplar a exposição dos líquens a um período de exposição mais longo, e com relação ao fotobionte, a observação dos efeitos de acordo com os estágios de desenvolvimento celular, compreendendo quais as células mais susceptíveis a danos e a dinâmica da população.

7 Referências bibliográficas

ALEXANDER J. A. Carbon Nanotube Structures and Compositions: Implications for Toxicological Studies. IN: Nanotoxicology: characterization, dosing and health effects, Edited by Nancy A. Monteiro-Riviere, C. Lang Tran. New York: Informa Healthcare USA; 2007.

ANASTASIO, C.; MARTIN, S.T. Atmospheric nanoparticles. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v.44, p.293-249, 2001.

ANDRE, P.A. **Câmara de Topo Aberto, CTA: construção e uso para observação de potencial tóxico da poluição atmosférica urbana com bioensaios em plantas**. 2007. 118f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

BANDARU, P.R.; FIRME, C.P. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. **Nanomedicine**, v.6, n.2, p. 245-256, 2010.

BEHRA, R.; KRUG, H. Nanoecotoxicology: nanoparticles at large. **Nature nanotechnology**, v.3, p.253-254, 2008.

BENATTI, M. N.; MARCELLI, M. P. Espécies de *Parmotrema* (Parmeliaceae, Ascomycota) do litoral centro-sul do estado de São Paulo, Brasil. I Grupos químicos girofórico e lecanórico. **Acta. Bot. Bras**, v. 23, n.4, p. 1013-1026, 2009.

BERTUZZI, S.; TRETACH, M. Hydrogen sulphide inhibits PSII of lichen photobionts. **The Lichenologist**, v.45, n. 1, p. 101-113, 2013.

BISWAS, P.; WU, C. Nanoparticles and the Environment. **Journal of the & Air Waste Management Association**, v.55, p.708-746, 2005.

BRITISH STANDARD INSTITUTION. BS EN 16413:2014: Ambient air. Biomonitoring with lichens. Assessing epiphytic lichen diversity. London. 2014.

BROWN, D.H.; BECKETT, R.P. Uptake and effect of cations on lichen metabolism. **Lichenologist**, v.16, p.173-188, 1984.

BROWN D. H. and BROWN R. M. Mineral Cycling and Lichens: the Physiological Basis. **Lichenologist**, v. 23, n.3, p. 293-307, 1991.

BROWN, D. H. and WELLS, J. M. Sequential elution technique for determining the cellular location of cations. IN *Methods in Bryology* (J. M. Glime, ed.): Nichinan: Hattori Botanical Laboratory., p. 227-233, 1988.

CAMPIDELLI, S; KLUMPP, C; BIANCO, A; GULDI, D.M.; PRATO, M. Functionalization of NTC: Synthesis and applications in photovoltaics and biology. **Journal of Physical Organic Chemistry**, n. 19, p.531-539, 2006.

CANÊZ, L.; MARCELLI, M. P. Gêneros de Parmeliaceae (Ascomycetes liquenizados) na localidade de Fazenda da Estrela, Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Pesquisas Série Biologia**, v. 18, n. 3, p. 38-88, 2006.

CLEBSCH, C.C.; JUNIOR, A.M.D.; OLIVEIRA, P.L.; NICOLAU, M. Physiological disturbances promoted by ozone in five cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. **Braz J Plant Physiol**, v.21, n.4, 2009. Disponível em: <http://www.teste.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04202009000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 14 set 2010.

CONTI, M.E.; CECCHETTI, G. Biological monitoring lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review. **Environmental Pollution**, v. 114, p. 471-492, 2001.

CONTI, M.E.; FINOIA, M.G.; TUDINO, M.B.; BOCCA, A.P.B.; ALIMONTI, A. Lichen *Usnea barbata* transplants as biomonitor of airborne elements deposition in the Tierra Del Fuego province (Patagonia, Argentina). In: 5th International Workshop on Biomonitoring of *Atmospheric* Pollution - BIOMAP, 2009. Programas e Resumos, Buenos Aires: Argentina, 2009, p. 91.

DE VOLDER, M.F.L.; TAWFICK, S.H.; BAUGHMAN, R.H.; HART, A.J. Carbon nanotubes: present and future commercial applications. **Science**, v.339, p.535-539, 2013.

CRUZ, M. B.; PEREIRA, E. C. G.; SILVA, N. H. ; MOTA-FILHO, F. O. ; MARTINS, M. C. B. Monitoramento da ação do formaldeído sobre *Cladia aggregata* (líquen), em condições de laboratório. **Revista Caminhos de Geografia**, v. 10, p. 76-87, 2009.

DATSYUK, V.; KALYVA, M.; PAPAGELIS, K.; PARTHENIOS, J.; TISIS, D.; SIOKOU, A.; et al. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **Carbon**, v.46, n.6, p.833-840, 2008.

DOBLEN, H.F.; WOLTERBEEK, H.Th.; WAMELINK, G.W.W.; BRAAK, C.J.F. Relationship between epiphytic lichens, trace elements and gaseous atmospheric pollutants. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 163-169, 2001.

DONALDSON, L.; STONE, V.; GILMOUR, P.S.; BROWN, D.M.; MACNEE, W. Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. **Phil Trans Roy Soc London A**, v. 358, p. 2741-2748, 2000.

ELIASARO, S.; DONHA, C. G. The genera *Canomaculina* and *Parmotrema* (Parmeliaceae, Lichenized Ascomycota) in Curitiba, Paraná State, Brazil. **Ver. Bras. Bot.**, v.26, n.2, São Paulo, 2003.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). In: EPA Nanotechnology and the Environment: Applications and Implications Star Progress Review Workshop, 2002, Virginia. **Proceedings...** Virginia: EPA, 2002. Disponível em: www.epa.gov/ncercqa/publications/workshop/nano_proceed.pdf. Acesso em: 27 out 2011.

EUROPEAN COMMISSION. In: Nanomaterials: Case by case safety approach for breakthrough technology. **Press Release**, Brussels: 2012. Disponível em: http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-12-732_en.htm. Acesso em: 09 mar 2015.

FIGUEIRA, R.; SOUSA, A.J.; BROWN, D.H.; CATARINO, F.; PACHECO, A.M.G. Natural levels of saline elements in lichens: determination of cellular fractions and their importance as saline tracers. **Lichenologist**, v.31, n.2, p.183-196, 1999.

FLEIG, M.; FILHO, J. W. M. Gêneros dos líquens saxícolas, cortícolas e terrícolas do Morro Santana, Porto Algere, RS. Brasil. **Acta. Bot. Bras.**, v. 4, n.2, 1990.

FREITAS, M.C.; ALMEIDA, S.M.; DUNG, H.M.; PACHECO, A.M.G.; PIO, C.A. Study of respiratory diseases in Lisbon basic school children with traffic emitted components. In: 5th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution - BIOMAP, 2009. Programas e Resumos, Buenos Aires: Argentina, 2009, p. 02.

FUGA, A.; SAIKI, M.; MARCELLI, M.P.; SALDIVA, P.H.N. Atmospheric pollutants monitoring by analysis of epiphytic lichens. **Environmental Pollution**, in press, 2007.

GEORGAKILAS, V; TAGMATARCHIS, N; PANTAROTTO, D; BIANCO, A; BRIAND, J- P; PRATO, M. Amino acid functionalisation of water-soluble carbon nanotubes. **Chemical Communications**, n.24, p. 3050-3051, 2002.

GUZMÁN, K.A.D.; TAYLOR, M.R.; BANFIELD, J.F. Environmental Risks of Nanotechnology: National Nanotechnology Initiative Funding, 2000–2004. **Environmental Science and Technology**, v.40, n.5, p.1401-1407, 2006.

HERZIG, R.; LIEBENDORFER, L.; URECH, M.; AMMANN, K.; GUECHEVA, M.; LANDOLT, W. Passive biomonitoring with lichens as a part of a integrated biological measuring system for monitoring air pollution in Switzerland. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 35, p. 43-57, 1989.

HOLISTER, P.; WEENER, J.W.; VAS, C.R.; HARPER, T. Nanoparticles. Cientifica, 2003. Disponível em: <http://www.romnet.net/ro/e-newsletter/e-newsletter13/FreeNanotechnology-download/nanoparticles_WP.pdf>. Acesso em: 14 set 2010.

IJIMA, S. Helical microtubes of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56–58, 1991.

INPI, INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INTELECTUAL. Busca – Patentes, 2014. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/portal/#>. Acesso em: 03 dez 2014.

JACKSON, P.; JACOBSEN, N.R.; BAUN, A.; BIRKEDAL, R.; KUHNEL, D.; JENSEN, K.A.; VOGEL, U.; WALLIN, H. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal*, v.7, n.154, p.1-21, 2013.

JERAN, Z.; MRAK, T.; JACIMOVIC, R.; BATIC, F.; KASTELEC, D.; MAVSAR, R.; SIMONCIC, P. Epiphytic lichens as biomonitors of atmospheric pollution in Slovenian forests. **Environmental Pollution**, v. 146, p. 354-331, 2007.

JORIO, A.; SAITO, R., DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M.S. Determination of nanotubes properties by Raman spectroscopy. **Phil. Trans. R. Soc. Lond**, v. 362, p. 2311–2336, 2004.

KAFFER M. I, LEMOS A. T.; APEL M. A., ROCHA J. V.; MARTINS S. M. A.; VARGAS V. M. F. 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.

KOSUGI, M.; ARITA, M.; SHIZUMA, R.; MORIYAMA, Y.; KASHINO, Y.; KOIKE, H.; SATOH, K. Responses to desiccation stress in lichens are diferente from those in their photobionts. **Plant Cell Physiology**, v.50, n.4, p.879-888, 2009.

LADEIRA, L.O.; SILVA, E.E.; OLIVEIRA, S.; LACERDA, R. G.; FERLAUTO, A. S.; ÁVILA, E.; LOURENÇON, E. Processo de síntese contínua e em larga escala de nanotubos de carbono sobre o clínquer de cimento e produtos nanoestruturados. Brazilian Patent, INPI 014080002727 (30.04.2008).

LIU, Q.; CHEN, B.; WANG, Q.; SHI, X.; XIAO, Z.; LIN, J.; et al. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. **Nano Lett**, v.9, n.3, p.1007-1010, 2009.

LONG, Z.; JI, J.; YANG, K.; LIN, D.; WU, F. Syestematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes' toxicity toward algae. **Environmental Science and Technology**, v.46, p.8458-8466, 2012.

LOPPI, S.; NELLI, L.; ANCORA, S.; BARGAGLI, R. Accumulation of trace elements in the peripheral and central parts of a foliose lichen thallus. **Bryologist**, vol. 100, p. 251-253, 1997.

LOPPI, S.; PUTORTÌ, E.; SIGNORINI, C.; FOMMEI, S.; PIRINTSOS, S.; DE DOMINICIS, V. A retrospective study using epiphytic lichens as biomonitors of air quality: 1980 and 1996 (Tuscany, central Italy). **Acta Oecologia**, v. 19, n. 4, p. 405-408, 1998.

LOPPI, S; FRATI, L. Lichen diversity and lichen transplants as monitors of air pollution in a rural area of central Italy. **Environ Monit Assess**, v. 114(1-3), p. 361-75, 2006.

LOVERN, S.B.; STRICKLER, J.R.; KLAPER, R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C₆₀, and C₆₀HxC₇₀Hx). **Environ Sci Technol**, v. 41, n.12, p. 4465-4470, 2007.

LUDVIG, P.; CALIXTO, J. M.; LADEIRA, L. O.; GASPAR, I. C. P. Using Converter Dust to Produce Low Cost Cementitious Composites by *in situ* Carbon Nanotube and Nanofiber Synthesis. **Materials**, v.4, p. 575-584, 2011.

MARCELLI, M. P.; BENATTI, M. N. Espécies de *Parmotrema* (Parmeliaceae, Ascomycetes liquenizados) com ácidos graxos ou atranorina medulares do litoral centro-sul do Estado de São Paulo. **Hoehnea**, v. 37(1), p. 117-129, 2010a.

MARCELLI, M. P.; BENATTI, M. N. Espécies de *Parmotrema* (Parmeliaceae, Ascomycetes liquenizados) com rizinas dimórficas do litoral centro-sul do Estado de São Paulo. **Hoehnea**, v. 35(2), p. 171-183, 2008.

MARCELLI, M. P.; BENATTI, M. N. Espécies de *Parmotrema* (Parmeliaceae, Ascomycota) do litoral centro-sul do Estado de São Paulo II. Grupos químicos norstíctico e salazínico. **Acta Bot. Bras.**, vol. 24 n.1, São Paulo, 2010b.

MARCELLI, M.P. History and current knowledge of Brazilian liquenology. In: **Lichenology in Latin America: history, current knowledge and application**. São Paulo: CETESB, p. 25-45, 1998.

MARTINS, S.M.A.; KAFFER, M.I.; KOCH, N.M.; ALVES, C.R.; LUCHETTA, F. Parmeliáceas de áreas alteradas no Rio Grande do Sul. In: 5ª Reunião Brasileira de Estudos Liquenológicos – REBEL, 2010. Livro de Anais, Catas Altas (Caraça): 2010, p. 16.

MARTINS, S.M.A.; KAFFER, M.I.; LEMOS, A. Líquens como bioindicadores da qualidade do ar numa termoeletrica, Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v.35, n.3, p.425-433, 2008.

MARTINS-MAZZITELLI, S.M.A.; MOTA FILHO, F.O.; PEREIRA, E.C.; FIGUEIRA, R. Utilização de líquens no biomonitoramento da qualidade do ar. In: L. Xavier Filho, M.E. Legaz, C.V. Córdoba & Pereira, E.C. (eds.). **Biologia de Líquens**. v. 3, 4 ed. Âmbito Cultural, Rio de Janeiro, p. 101-133, 2006.

NANOTECH PROJECT. Consumer Products Inventory. Search Results Nanomaterials: Carbon nanotubes, 2014. Disponível em: http://www.nanotechproject.org/cpi/search-products/?title=&asmSelect0=&date_created=&date_modified=&nanomaterials%5B%5D=1129&search-products_submit=Search&_submitKey=16%3Asearch-products%3A0. Acesso em: 13 mar 2015.

NASH III, T.H. Lichen Biology. Ed. Cambridge University Press, Cambridge: 2008.

NEL, A.; XIA, T. MENG, H; WANG, X; LIN, S.; JI, Z.; ZHANG H. Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 607–621, 2013.

NIEBOER, E.; RICHARDSON, D.H.S. The replacement of nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. **Environmental Pollution Series B**, v.1, p.3-26, 1980.

NIEBOER, E.; RICHARDSON, D.H.S; LAVOIE, P.; PADOVAN, D. The role of metal ion binding in modifying the toxic effects of Sulphur dioxide on the lichen *Umbilicaria muhlenbergii*, **New Phytologist**, v. 82, p.621-632, 1979.

NYLANDER, W. Les lichens du Jardim du Luxembourg. **Bulletin Societe Botanique de France**, v. 13, p. 364-372, 1866.

OBERDORSTER, G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. **Int Arch Occup Envir Health**, v. 74, p. 1-8, 2001.

OBERDOSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **J Intern Med**, v.267, n.1, p.89-105, 2010.

PAOLI, L.; PISANI, T.; GUTTOVÁ, A.; SARDELLA, G.; LOPPI, S. Integrated control of the air pollution from industrial activities in the Mediterranean area: a case study based on lichen surveys. In: 5th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution - BIOMAP, 2009. Programas e Resumos, Buenos Aires: Argentina, 2009, p. 60.

PAOLI, L.; GUTTOVÁ, A.; GRASSI, A.; LACKOVICOVÁ, A.; SENKO, D.; LOPPI, S. Biological effects of airborne pollutants released during cement production assessed with lichens (SW Slovakia). **Ecological Indicators**, v.40, p.127-135, 2014.

PERERA, F.P.; RAUH, V.; WHYATT, R.M.; TSAI, W.; TANG, D.; DIAZ, D.; HOEPNER, L.; BARR, D.; TU, Y.; CAMANN, D.; KINNEY, P. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n.8, p. 1287-1292, 2006.

PEREIRA, M.M.; MOUNTON, L.; YÉPRÉMIAN, C.; COUTÉ, A.; LO, J.; MARCONCINI, J.M.; LADEIRA, L.O.; RAPOSO, N.R.; BRANDÃO, H.M.; BRAYNER, R. Ecotoxicological effects of carbono nanotubes and cellulose nanofibers in *Chlorella vulgaris*. **J Nanobiotechnology**, p.12-15, 2014.

PEVELING, E.; KONIG, J. Differences in formation of vegetative cells and their walls in *Trebouxia* as further evidence for the classification of these genera. **Lichenologist**, v.17, n.3, p.281-287, 1985.

PICCINNO F, GOTTSCHALK F, SEEGER S, NOWACK B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in europe and the world. **J. Nanopart. Res.** v.14, p.1-11, 2012.

PICCOTO, M; BIDUSSI, M.; TRETACH, M. Effects of the urban environmental conditions on the chlorophyll a fluorescence emission in transplants of three ecologically distinct lichens. **Environ. Exp. Bot.**, v.73, p.102-107, 2011.

QUINA, F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27(6), p. 1028-1029, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422004000600031&script=sci_arttext&tlng=en. Acesso em: 10 ago 2010.

RODRIGUES, L. **Nanotubos de carbono de parede única e de múltiplas paredes como transportadores de oligonucleotídeos para o interior do fungo *Uromyces appendiculatis* (Pers.:Pers.) Ungler**. 2008. 109f. Tese (Doutorado em Microbiologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

RODRIGUEZ, J.H.; WANNAZ, E.D.; WELLER, S.B.; PIGNATA, M.L. Biomonitoring of atmospheric trace elements in agricultural areas and a former uranium mine. **Biomonitoring**, v.1, n.1, 2014.

SANTOS, J. C. C. **Síntese e Caracterização de Nanocompósitos PVA/Nanotubos de Carbono para Potencial Aplicação Biomédica**. 2011. 133f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e Materiais) Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

SARRET, G.; MANCEAU, A.; CUNY, D.; VAN HALUWYN, C.; DÉRUEL, S.; HAZEMANN, J.L.; SOLDI, I.; EYBERT-BÉRARD, L.; MENTHONNEX, J.J. Mechanism of lichen resistance to metallic pollution. *Environmental Science and Technology*, v. 32, p.3325-3330, 1998.

SAVOLAINEN, K.; BACKMAN, U.; BROUWER, D.; FADEEL, B.; FERNANDES, T.; KUHLBUSCH, T.; LANDSIEDEL, R.; LYNCH, I.; PYLKKÄNEN, L. Nanosafety

in Europe 2015-2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations. **Finnish Institute of Occupational Health**, EDITA 2013.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A; CHEN, W. AND FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **PNAS Early Edition**, p.1-6, 2012.

SILVA, A.K.O.; PEREIRA, I.M.C.; SILVA, N. H.; MOTA-FILHO, F.O.; PEREIRA, E.C. Líquens utilizados como biomonitoradores da qualidade do ar no Parque da Jaqueira, Recife, Pernambuco, **GeoUERG**, v. 1, n.25, p. 239-256, 2014.

SPIELMANN, A. A. **Estudos taxonômicos em *Parmotrema* s.l. (*Parmeliaceae*, *Ascomycota* liquenizados) com ácido salazínico**. 2009. 165 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

SPIELMANN, A. A.; MARCELLI, M. P. *Parmeliaceae* (*Ascomycota* liquenizados) nos barrancos e peraus da encosta da Serra Geral, Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil. II. Gêneros *Canoparmelia*, *Hypotrachyna*, *Myelochroa*, *Parmelinopsis* e *Relicina*. **Iheringia**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 193-212, 2008.

SZCZEPANIAK, K.; BIZIUK, M. Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution. **Environmental Research**, v. 93(3), p. 221-230, 2003.

THE ROYAL SOCIETY and THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. **The Royal Society**, 2004. Disponível em: <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>. Acesso em: 27 out 2011.

VAZ, R.P. **Levantamento preliminar de líquens epifíticos comumente utilizados como bioindicadores da qualidade do ar na Estação Ecológica da UFMG, Brasil: gêneros *Parmotrema* e *Canoparmelia***. 2012.60f. Monografia (Especialização em Microbiologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

VIANA, C. O. **Uso de líquens como biomonitoradores na avaliação da contribuição de fontes poluidoras**. 2010. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2010.

VIANA, C. O.; MENEZES, M. A. B. C.; MAIA, E. C. PEREIRA. Epiphytic lichens on air biomonitoring in Belo Horizonte City, Brazil: a preliminary assessment. **International Journal of Environment and Health**, v. 5, p. 324-337, 2011.

WELLBURN, A R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol**, v.144, p.307-313, 1994.

WOLTERBEEK, B. Biomonitoring of trace elements: principles, possibilities and perspectives. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 11-21, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2004). Health aspects of air pollution: results from the WHO project “Systematic Review of Health Aspects of Air Pollution in Europe”. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=18776&indexSearch=ID>>. Acesso em: 28 fev 2010.

WHITING, M.F.; CARPENTER, J.C.; WHEELER, Q.D.; WHEELER, W.C. The streptiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. **Systematic Biology**, v.46, n.1, p.1-68, 1997.

XING, Y.; LI, L.; CHUSUEI, C.C.; HULL, R.V. Sonochemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes, **Langmuir**, v.21, n.9, p.4185-4190, 2005.

Anexo 2 – Autorização para coleta



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 40244-1	Data da Emissão: 02/07/2013 10:59
Dados do titular	
Nome: Camila de Oliveira Viana	CPF: 062.668.176-67

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna; e d) coleta em Áreas de Preservação Permanente (APP).
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Taxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	REINO	Fungi

Anexo 3 - Ficha de caracterização completa

número espécime	coleta		coordenadas		córTEX superior							córTEX inferior			medula					
	data da coleta	ref. da coleta	S	W	adnato?	lacinado ou lobado? ápice redondo ou truncado?	tam. lobo/lacina (cm)	cor	pseudocifela?	cílios? 1- bulbado, 2- não bulbado, 3- abundante, 4- raro, 5- grande, 6- pequeno	máculas? originais? quebras?	apotecíio?	isídio ou soreíio?	teste K (atrancina: +amarelo)	cor zona nua	tam. zona nua (mm)	rizinas? 1- simples, 2- ramificada, 2a- dicotômica, 2b- não dicotômica, 3- dimórficas, 4- monomórficas, 5- longa, 6- curta	cor	teste C	teste K
1	10/28/2013	C02	19° 15.4'	043° 3'	Não	Lobado	0.4	verde a	Não	Sim, 2, 3	Sim. Não	Não	Soréd	Pos. Am	Marror	3	1, 4, 5	Branca	Neg.	Pos. Ar
2	10/28/2013	C03	19° 15.4'	043° 3'	Não	Lobado	0.7	verde a	Não	Sim, 2, 4	Sim. Não	Sim	Nada	Pos. Am	Marror	4	1, 4, 6	Branca	Neg.	Pos. Ar
3	10/28/2013	C04	19° 15.4'	043° 3'	Não	Lobado	0.5	verde a	Não	Sim, 2, 4	Não	Não	Soréd	Pos. Am	Marror	2	1, 4, 6	Branca	Neg.	Pos. Ar
4	10/28/2013	R05	19° 15.4'	043° 3'	Não	Lobado	0.7	verde a	Não	Sim, 2, 3	Sim. Não	Não	Nada	Pos. Am	Marror	2	1, 4, 6	Branca	Neg.	Pos. Ar
5	10/20/2013	R05	19° 15.4'	043° 3'	Não	Lobado	0.7	verde a	Não	Sim, 2, 3	Sim. Sim	Não	Nada	Pos. Am	Marror	2	1, 4, 6	Branca	Pos. V	Pos. Ar
6	10/30/2013	C20	VER NO GPS		Não	Lobado	1	verde	Não	Sim, 2, 3	Não	Sim	Nada	Pos. Am	Marror	6	1, 4, 6	Branca	Neg.	Neg.
7	10/30/2013	C20			Não	Lobado	1	verde c	Não	Sim, 2, 4	Sim. Sim	Não	Nada	Pos. Am	Marror	3	1, 4, 6	Branca	Neg.	Pos. Ar
8	10/30/2013	C20			Não	Lobado	1.1	verde	Não	Sim, 2, 3	Sim. Sim	Sim	Nada	Pos. Am	Marror	4	1, 4, 6	Branca	Neg.	Pos. Ar
9	10/30/2013	C20			Frouxa	Lobado	0.5	verde	Não	Não	Sim. Não	Não	Soréd	Pos. Am	Marror	2	1, 4, 6	Branca	Neg.	Neg.
10	10/30/2013	C20			Não	Lacina	0.6	verde a	Não	Não	Não	Sim	Nada	Pos. Esv	Marror	3	1, 4, 6	Branca	Pos. La	Neg.
11	10/30/2013	C20			Não	Lobado	0.9	verde	Não	Sim, 2, 3	Sim. Não	Não	Soréd	Pos. Am	Marror	3	1, 4, 6	Branca	Neg.	Pos. Ar
12	10/30/2013	C20			Não	Lobado	1	verde	Não	Sim, 2, 4	Sim. Não	Não	Nada	Pos. Am	Marror	4	1, 4, 6	Branca	Neg.	Pos. Ar
13	10/30/2013	C20			Não	Lobado	1	verde c	Não	Não	Não	Não	Soréd	Pos. Am	Marror	5	1, 4, 5	Branca	Neg.	Pos. Ar
14	10/30/2013	C20			Não	Lobado	0.9	verde	Não	Não	Não	Não	Soréd	Pos. Am	Marror	6	1, 4, 6	Branca	Pos. La	Pos. Ar
15	10/30/2013	C20			Frouxa	Lobado	0.3	verde	Não	Sim, 2, 4	Não	Sim	Nada	Pos. Am	Marror	2	1, 4, 6	Branca	Neg.	Neg.
16	10/30/2013	C20			Não	Lobado	0.5	verde	Não	Não	Não	Sim	Nada	Pos. Am	Marror	3	1, 2a, 2b, 3,	Branca	Pos. La	Neg.
17	10/30/2013	C20			Frouxa	Lobado	0.7	verde c	Não	Não	Sim. Não	Não	Soréd	Pos. Am	Marror	2	1, 4, 6	Branca	Neg.	Pos. Ar
18	10/30/2013	C20			Frouxa	Lobado	0.6	verde v	Não	Não	Alguma	Não	Soréd	Pos. Am	Marror	2	1, 4, 6	Branca	Neg.	Pos. Ar
19	10/30/2013	C20			Não	Lobado	0.5	verde c	Não	Não	Não	Não	Soréd	Pos. Am	Marror	3	1, 2a, 2b, 3,	Branca	Neg.	Neg.
20	10/30/2013	C20			Frouxa	Lobado	0.3	verde	Não	Não	Não	Sim	Nada	Pos. Am	Marror	2	1, 4, 6	Branca	Pos. La	Amare
21	10/30/2013	C20			Não	Lobado	0.6	verde a	Não	Sim, 2, 3	Sim. Não	Sim	Nada	Pos. Esv	Marror	3	1, 4, 5	Branca	Neg.	Neg.

Anexo 4 - Projeto de pesquisa submetido à Fundação Boticário de Conservação

PROJETO DE PESQUISA

Diversidade de líquens foliosos da Serra do Cipó

Síntese da Proposta A Serra do Cipó, localizada na porção sul da Serra do Espinhaço, é famosa por sua biodiversidade e endemismo, no entanto ainda hoje não existem trabalhos publicados inventariando as espécies de líquens do local. Frente à escassez de informações sobre este recorte da biodiversidade, esta pesquisa tem como propósito fazer um levantamento das espécies de líquens na região. Além de enriquecer o conhecimento da biodiversidade local, estes dados poderão auxiliar ações de manejo do Parque, através da definição futura do status de ameaça à extinção das espécies, graus de endemismo, e ainda, ser base para outros trabalhos. A metodologia de trabalho compreenderá a coleta de espécimes, de dados de georreferenciamento e o registro fotográfico dos líquens foliosos encontrados. A identificação das espécies seguirá modelo clássico, mas também incluirá a prospecção do material genético, dados estes inéditos no estudo taxonômico deste grupo no Brasil. A identificação das espécies de dará pela caracterização morfológica e química, sendo que espécimes testemunho serão depositados em coleções científicas. Complementar à identificação clássica será realizada a identificação a partir dos códigos de barras de DNA, gerados a partir de dados moleculares e que serão depositados na Biblioteca de Código de Barras de DNA de Fungos (FungiBrBOL) da Rede Nacional de Identificação Molecular da Biodiversidade Brasileira (BrBOL). Ainda, como forma de potencializar a acessibilidade ao conhecimento científico gerado, propõe-se a elaboração de uma plataforma online na qual serão divulgados os resultados gerados pelo projeto. Este catálogo virtual deverá conter desde informações básicas sobre a Serra do Cipó e a biologia dos líquens – para o público em geral - até a disponibilização de dados mais aprofundados de interesse da comunidade científica e acadêmica. A demonstração deste recorte da biodiversidade da área virá contribuir em ações de conservação e na conscientização da importância de tais ações.

Justificativa Este projeto se justifica principalmente pela enorme importância da biodiversidade da Serra do Cipó no cenário da biodiversidade nacional e a ausência de publicações sobre a biodiversidade líquênica na região. Este projeto ainda se justifica pelo pouco conhecimento a respeito da biodiversidade líquênica mineira e brasileira; pela necessidade de enriquecimento dos acervos dos herbários nacionais; pela ausência de dados de fungos liquinizados na biblioteca FungiBrBol e o ineditismo deste tipo de iniciativa em relação aos dados da biodiversidade líquênica brasileira, e pela

necessidade de formação de pessoal qualificado em taxonomia de líquens (principalmente em Minas Gerais).

Equipe

- Dr. Marcelo P. Marcelli, Liqueenólogo do Instituto de Botânica de São Paulo (IBot)
- Dr. Aristóteles Góes Neto, Microbiologista (UEFS)
- Lara Ambrosio, Mestranda em Microbiologia (UFMG)
- Raissa Pieroni Vaz, Mestranda em Microbiologia (UFMG)
- Lucas Perillo, graduando em Ciências Biológicas (UFMG)

Métodos

Expedições de coleta e seleção de pontos de amostragem

Espécimes de fungos liquenizados do tipo folioso serão coletados no Parque Nacional da Serra do Cipó em altitudes acima de 800m, entre os paralelos 19°12' - 19°20' S e longitude 43°30' – 43°40' W.

As expedições de coleta serão realizadas bimestralmente ao longo de 18 meses em locais distintos do Parque, somando um total de 9 pontos de coleta. Cada expedição contará com uma equipe composta por 3 a 5 pessoas e terá duração aproximada de 5 dias. As coletas para levantamento da biodiversidade serão efetuadas de modo intensivo, através de procura ativa por todos os hábitat e substratos disponíveis numa região e amostrando-se todas as espécies encontradas.

Os pontos de coleta serão selecionados a observando a representação de todas as formações vegetais da Serra do Cipó.

Coleta

A coleta e preparação do material seguirão métodos clássicos em liquenologia, que em resumo incluem:

- Registro fotográfico do espécime ainda no substrato;
- Coleta dos espécimes inteiros sempre que possível;
- Coleta dos espécimes sem substrato sempre que possível;
- Acondicionamento e secagem dentro de sacos de papel;
- Elaboração de etiquetas completas para cada espécime; contendo inclusive as coordenadas geográficas relativas a localização da amostra e o número da fotografia.

Dados de georreferenciamento das amostras de uma expedição servirão também para monitorar os pontos amostrados, impedindo sua repetição e auxiliando a seleção do próximo ponto.

Triagem, rotulagem e preparação do material para estudo

Após cada expedição, o material coletado passará por um processo de limpeza, triagem e rotulagem. Nesta etapa, um pequeno fragmento do talo (em torno de 10mg de peso seco), será separado para a prospecção do material genético. Esta etapa será realizada nas dependências do Laboratório de Infecções Fúngicas da UFMG.

Identificação das espécies (método clássico)

A identificação de espécies de fungos liquenizados é feita principalmente através de:

- Detalhado estudo morfológico das estruturas vegetativas e reprodutoras (com estereomicroscópio);
- Detalhado estudo anatômico das estruturas vegetativas e reprodutoras (com microscópio);
- Análise química por métodos de coloração, microcristalização e fluorescência ao UV.

Após as análises morfológicas e anatômicas, a identificação de gêneros e espécies será realizada com o auxílio de bibliografia técnica. A principal bibliografia taxonômica utilizada na identificação é mencionada em Marcelli et al. (1998) adicionada das dissertações e teses produzidas pelo Grupo de Liquenologia do Instituto de Botânica (IBot) (citadas no "Histórico"). Estas análises serão realizadas após cada expedição, gerando semestralmente resultados parciais relativos à diversidade de líquens de determinada região do Parque.

Preparação e montagem do material para herbário

O material identificado será, então, definitivamente montado e depositado nos herbários do Instituto de Botânica (IBot/SP). Duplicatas serão depositadas no herbário da UFMG.

Identificação molecular das espécies

Após cada coleta, os fragmentos dos talos de cada amostra de líquen coletado em campo e separados na etapa de triagem, serão submetidos à extração do DNA total. A integridade e a concentração do DNA obtidos serão analisadas utilizando espectrofotômetro e gel de agarose. O DNA será utilizado como molde em reações para amplificação do segmento de DNA que abrange a região de código de barras proposta para a identificação de fungos (Schoch et al, 2012). Os produtos obtidos serão enviados para seqüenciamento e as seqüências serão submetidas à análises.

Análises dos dados moleculares

No último semestre, as seqüências obtidas serão agrupadas com base nos resultados finais da identificação clássica (de acordo com a espécie ou morfotipo identificados), para a geração do código de barras. Posteriormente, os códigos de barras serão depositados na Biblioteca de Código de Barras de DNA de Fungos (FungiBrBOL).

Resultados para a conservação (1000 caracteres)

Não existem trabalhos publicados que inventariam a diversidade líquênica da Serra do Cipó. Na plataforma do Herbário Virtual da Flora e dos Fungos há apenas 81 registros referentes à fungos liquinizados coletados na Serra do Cipó. Grande parte deste número corresponde à coletas realizadas entre 1985 e 1987, dentre as quais apenas 14 apresentam a identificação completa, ou seja, o nome da espécie. A outra parte corresponde à amostras coletadas em 2011 e apresentam identificação incompleta. Em relação aos dados moleculares, este trabalho é pioneiro no Brasil. Com base nos resultados deste trabalho será possível detectar espécies endêmicas e, futuramente, estabelecer o nível de ameaça à extinção de cada espécie encontrada. Ainda, será possível acompanhar a comunidade líquênica local, viabilizando ações de biomonitoramento ambiental, dado que os fungos liquinizados estão entre os principais bioindicadores de qualidade e de alteração ambiental.

Autorização ambiental A autorização para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico foi obtida junto à SisBIO sob número 40244-1.

Para a prospecção do material genético, como esta parte do projeto visa complementar a identificação com dados da diversidade genética, observamos que estamos dispensados de autorização junto ao CGEN (com base no conceito de “acesso ao patrimônio genético” e conforme a Resolução 21).

Plano de comunicação (Este plano pretende disseminar de forma educativa o conhecimento científico gerado durante a pesquisa. Será criada uma plataforma online contendo as fotos identificadas, e informações gerais sobre biologia de líquens, até o mapa com a localização das espécies encontradas. Esta plataforma será desenvolvida no primeiro semestre do projeto, e os dados serão disponibilizados, formando o catálogo, assim que obtidos. O lançamento do catálogo virtual **completo** será feito durante uma exposição fotográfica que contará com fotos da publicação e outras seleções que narrem imagicamente as etapas da pesquisa. Também serão organizadas oficinas intituladas “Líquens - Protegemos o que conhecemos” com objetivo de demonstrar a importância dos líquens para o biomonitoramento ambiental do Parque, do bioma Cerrado e das cidades. As oficinas serão destinadas

a dois grupos: gestores, guardas e educadores do Parque; e estudantes das escolas da rede pública das comunidades do entorno deste.

Espécies ameaçadas Não existe registro de espécies ameaçadas, visto à ausência de dados sobre a diversidade deste grupo taxonômico na Serra do Cipó.

Histórico e interfaces do projeto com outras iniciativas Desde 1990 líquenólogos do Instituto de Botânica vem trabalhando ativamente no levantamento de algumas áreas e/ou grupos taxonômicos, produzindo vários trabalhos (Marcelli 1998, 2002; Benatti et al 2013; Kitaura e Marcelli 2013; Jungbluth et al 2013). Em Minas Gerais, são pontuais os trabalhos relacionados à fungos liqueinizados, tanto sobre levantamentos florísticos quanto ao uso destes organismos como biomonitoradores (Viana et al 2011; Vaz 2012). No ano passado, uma expedição de coleta foi realizada da Serra do Cipó, como parte da tese de doutorado de Camila de Oliveira Viana, onde foi coletada uma espécie de líquen para realização de experimentos de biomonitoramento, e observada, pelo registro fotográfico, a diversidade de líquens da região do Alto Palácio da Serra do Cipó. Desta forma surgiu a ideia de realizar um levantamento no local.

Referências Bibliográficas

BENATTI, M. N. ; KITAURA, M. J. ; CUNHA, I. P. R. ; MARCELLI, M.P. 2013. Cianolíquens dos gêneros *Coccocarpia*, *Collema* e *Leptogium* do Parque Estadual da Cantareira, SP, Brasil, depositados no herbário SP. *Hoehnea* (São Paulo), v. 40, p. 131-141..

JUNGBLUTH, P.; MARCELLI, M.P. 2012. Identificação de *Physciaceae* s.l. foliosas brasileiras. *GLALIA - Revista Electrónica del Grupo Latinoamericano de Líquenólogos*, v. 4, p. 65-101.

KITAURA, M. J. ; MARCELLI, M. P. 2013 . A revision of *Leptogium* species with spherical-celled hairs (section *Mallotium* p.p.). *The Bryologist*, v. 116, p. 15-27, 2013

MARCELLI, M.P. 1998a. Diversidade dos fungos liqueinizados no Estado de São Paulo: um diagnóstico. In Joly, C.A. & Bicudo, C.E.M. (eds.) *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*. Vol.2: 25-35. FAPESP. São Paulo.

MARCELLI, M.P. 1998b. History and current knowledge of Brazilian Lichenology. In Marcelli, M.P. & Seaward, M.R.D. (eds) *Lichenology in Latin America: history, current knowledge and applications*. CETESB. São Paulo: 25-45.

MARCELLI, M.P. 2002. *Checklist of lichens and lichenicolous fungi from Brazil (Versão 3)*. Publicação na Internet, pela Universität Hamburg - Institut für Allgemeine Botanik, dentro do programa South American Lichens Online em: http://www.rra.uni-hamburg.de/biologie/ialb/herbar/brazi_f2.htm. Versão 1: desde

18/05/1999. 88p.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A; CHEN, W. AND FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS Early Edition, 1-6.

SPIELMANN, A.A. 2009. Estudos taxonômicos em *Parmotrema* s.l. (*Parmeliaceae*, *Ascomycota* liquenizados) com ácido salazínico. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica – IBt, São Paulo. 152 p.

VAZ, R.P. 2012 Levantamento preliminar de líquens epifíticos comumente utilizados como bioindicadores da qualidade do ar na estação ecológica da UFMG, Brasil: Gêneros *Parmotrema* e *Canoparmelia*. Monografia (Especialização em Microbiologia) –Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Minas Gerais, 62 p.

VIANA, C. O.; MENEZES, M. A. B. C. 2011 Epiphytic lichens on air biomonitoring in Belo Horizonte City, Brazil: a preliminary assessment. *Int. J. Environment and Health*, v. 5, n.4.

9 Publicações

Resumos publicados em anais de congressos

VAZ, R. P.; VIANA, C. O.; CORREA JUNIOR, A. Levantamento preliminar de fungos liqueinizados biomonitores da qualidade do ar na Estação Ecológica da UFMG, MG, Brasil. In: VIII Fórum de Microbiologia, 2012, Belo Horizonte. VIII Fórum de Microbiologia: a microbiologia na era da metagenômica, 2012.

LEVANTAMENTO PRELIMINAR DE FUNGOS LIQUENIZADOS BIOMONITORES DA QUALIDADE DO AR NA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DA UFMG, BRASIL

Vaz, R. P.; Junior, A. C.; Viana, C. O.

Laboratório de Mecanismos de Infecções Fúngicas, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: ra.pv@hotmail.com.

O biomonitoramento utilizando fungos liqueinizados é realizado desde o século XIX, sendo uma alternativa vantajosa e complementar a outros tipos de monitoramento da qualidade do ar. Neste contexto, o conhecimento da comunidade liquênica - além de apresentar importância ecológica - na condução de estudos de biomonitoramento faz-se imprescindível. No Brasil, os principais gêneros utilizados como biomonitores da qualidade do ar são *Parmotrema* e *Canoparmelia* (Parmeliaceae, Ascomycota). O presente estudo teve como objetivo relatar a ocorrência desses gêneros no biótopo Cerrado da Estação Ecológica da UFMG e o desenvolvimento de um método para identificação em campo. A seleção das amostras foi realizada a partir da observação de características morfológicas específicas destes gêneros. Fotografias, dados relativos à localização, luminosidade, características do forófito e parâmetros morfológicos e químicos do talo foram observados em campo e anotados na Ficha de Identificação desenvolvida. Posteriormente, a identificação dos morfotipos foi realizada com o auxílio de chaves de identificação presentes na literatura e consulta a especialistas. Foram relatados 27 morfotipos diferentes, de modo que os morfotipos mais frequentes foram *Canoparmelia crozalsiana* (21,9%) e *Parmotrema tinctorum* (9,8%). Os morfotipos *Parmotrema sp7*, *Myelochorea lindmanni* e Morfotipo II (não identificado) obtiveram frequência de 4,9% cada um. Os demais morfotipos obtiveram frequências iguais (2,5% cada). Houve uma predominância do gênero *Parmotrema* (43%) seguido do gênero *Canoparmelia* (31,7%), os morfotipos restantes somaram 24,3% das amostras. A Ficha de Identificação elaborada gerou bons resultados, permitindo a identificação dos gêneros de 82,9% das amostras. Resultados como estes são de grande valia, visto que, não existem trabalhos inventariando a comunidade liquênica do local, além de darem subsídio a futuros estudos de biomonitoramento.

Palavras-chave: Fungos liqueinizados, Biomonitoramento, *Parmotrema*, *Canoparmelia*.

VIANA, C. O.; CANDOTTO-CARNIEL, F.; BERTUZZI, S.; BOSI, S.; CORREA JUNIOR, A.; TRETIACH, M. Physiological Effects of Carbon Nanotubes Exposure in a Lichen Photobiont. In: 6th International Workshop on Biomonitoring of Air Pollution, 2012, Çeşme-İzmir. 6th INTERNATIONAL WORKSHOP on BIOMONITORING of ATMOSPHERIC POLLUTION, 2012. p. 16-17.

Physiological Effects of Carbon Nanotubes Exposure in a Lichen Photobiont

C.O. VIANA¹, F. CANDOTTO CARNIEL², S. BERTUZZI², S. BOSI³, A. CORREA JR¹, M. TRETIACH²

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antonio Carlos 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; camilaoviana@gmail.com

² Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Via L. Giorgieri 10, 34127 Trieste, Italy

³Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Trieste, Piazzale Europa 1, 34127 Trieste, Italy; tretiach@units.it

The potential of nanotechnology to bring benefits to many areas of research, industry and health has been largely recognized, which explains the increase in investments by governments and businesses all around the world. New materials and nanoproducts are introduced, increasing the source of engineered nanoparticles to the environment, when very few data on the environmental impact and/or ecotoxicology are available. In this study we analyzed the effects of a functionalized multiwalled carbon nanotube (f-MWCNT) on a lichen photobiont, as a first contribution in a project aimed at verifying the potential use of lichens as biomonitors of carbon nanotubes (NTC) aerosols. The coccoid green alga *Trebouxia* sp., isolated from the lichen *Parmotrema perlatum* (Huds.) M. Choisy and cultured in axenic conditions, was exposed to f-MWCNTs under two interaction conditions – re-suspended in a nanotube dispersion before inoculation and inoculated on acetate or glass fiber discs containing nanotubes on the surface – at 0.01, 1.0 and 100 µg/mL. After the inoculation, the cultures were maintained in a growing chamber for 21 days at optimal conditions in closed petri dishes, on solid 3 Nitrogen *Trebouxia* medium, together with controls, i.e. other cultures obtained from the original liquid suspension, not exposed to f-MWCNT. The following parameters were monitored: (i) growth (at six-day intervals, by taking color photographs with a Nikon Coolpix 8400 digital camera), (ii) chlorophyll content (spectrophotometrical readings of DMSO crude extracts), (iii) chlorophyll a fluorescence emission of dark- and light-exposed samples (by means of a pulse-amplitude-modulated fluorimeter Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Germany), (iv) membrane damage (Sytox Green S-7020

stained cells observed with a confocal laser scanning microscope C1-si, Nikon, Tokyo, Japan). The presence of carbon nanotubes on the surface of both types of discs did not affect the cultures of *Trebouxia sp.* On the contrary, those derived from algae re-suspended in the CNT dispersions had lower chlorophyll content than the control, and most of their cells showed consistent membrane damage, although the photosynthetic efficiency, expressed by the F_v/F_m ratio, was not significantly affected. Surprisingly, no dose-dependent response was observed comparing the 3 different concentrations. The environmental implications suggested by these results are shortly addressed also on the basis of the most recent literature.

VIANA, C. O. ; SANTOS, A. P. ; LADEIRA, L. O. ; CORREA JUNIOR, A. . Carbon nanotubes effects in the lichen *Parmotrema tinctorum*. In: 9th International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles, Columbia. Nano 2014, 2014. p. 32-32.

Carbon nanotubes effects in the lichen *Parmotrema tinctorum*

CAMILA DE OLIVEIRA VIANA¹; ADELINA PINHEIRO SANTOS²; LUIZ ORLANDO LADEIRA³; ARY CORREA JUNIOR¹

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil;
camilaoviana@gmail.com

² Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN), Belo Horizonte, MG 30123-970, Brazil

³ Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Since their discovery, carbon nanotubes (CNT) uses have been extensively explored. CNT are already being used as cement composites and it is possible to buy a tennis racquet made from composites containing carbon nanotubes. Being its release in all environment compartments a reality, where its fate and behavior are largely unknown, this study aims to start an investigation on the use of lichens - classical indicators of atmospheric pollution - as potential biomonitors of carbon nanotubes aerosols. In this preliminary study, we analyzed some ecotoxicological effects of a functionalized multiwalled carbon nanotube (MWCNT-COOH) on foliose lichen specie. *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale thallus were carefully transplanted to an open top chamber and exposed to 0.01, 1.0 and 100 µg/mL of MWCNT-COOH water dispersion. Samples were treated daily during 15 days, with positive (activated carbon) and negative (water) controls. So far, the chlorophyll a fluorescence emission of dark- and light-exposed samples (by means of a pulse-amplitude-modulated fluorimeter Mini-Pam) and electrical conductivity (measured using a digital conductometer) were analyzed. No dose-dependent response was observed comparing the 3 different concentrations. A significant increase on ion leakage from the high concentration and positive control was observed. The photosynthetic efficiency, expressed by the F_v/F_m ratio, was not affected. These results are in agreement with a previous study concerning the lichen photobiont responses to MWCNT exposition. Further steps will comprise the investigation of membrane damage causes and CNT cellular uptake and location inside the lichen thallus.

Apresentações de Trabalho

VIANA, C. O. Physiological Effects of Carbon Nanotubes Exposure in a Lichen Photobiont. 2012. (Apresentação Oral no 6th INTERNATIONAL WORKSHOP on BIOMONITORING of ATMOSPHERIC POLLUTION).

VIANA, C. O. O uso de líquens no biomonitoramento de nanopartículas: possibilidades e desafios. 2014. (Palestrante convidada no SÉTIMO ENCONTRO BRASILEIRO DE LIQUENOLOGIA)

Cursos de Aprofundamento

Curso de identificação e variabilidade morfológica de líquens. Realizado na Seção de Liquenologia e Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo com supervisão do Prof. Dr. Marcelo Pinto Marcelli. 13-17 junho 2011.

Physiological Effects of Carbon Nanotubes Exposure in a Lichen Photobiont

C.O. VIANA¹, F. CANDOTTO CARNIEL², S. BERTUZZI², S. BOSI³, M. PRATO³, A. CORREA JR¹, M. TRETIACH²

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antonio Carlos 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; camilaoviana@gmail.com

²Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Via L. Giorgieri 10, 34127 Trieste, Italy; tretiach@units.it

³Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Trieste, Piazzale Europa 1, 34127 Trieste, Italy

Abstract

Nanotechnology based consumer products containing different types of nanoparticles are growing very rapidly. The applications expand while little is still known about the environmental impact and/or ecotoxicology of nano-sized nanoparticles. In this study we analyzed the effects of a functionalized multiwalled carbon nanotube (f-MWCNT) on a lichen photobiont, as a first contribution in a project aimed at verifying the potential use of lichens as biomonitors of carbon nanotubes (CNT) aerosols. The coccoid green alga *Trebouxia* sp., isolated from the lichen *Parmotrema perlatum* (Huds.) M. Choisy and cultured in axenic conditions, was exposed to f-MWCNTs under two interaction conditions – re-suspended in a nanotube dispersion before inoculation and inoculated on acetate or glass fiber discs containing nanotubes on the surface – at 0.01, 1.0 and 100 µg/mL. After the inoculation, the cultures were maintained in a growing chamber for 21 days at optimal conditions in closed petri dishes, on solid 3 Nitrogen *Trebouxia* medium, together with controls, i.e. other cultures obtained from the original liquid suspension, not exposed to f-MWCNT. The following parameters were monitored: (i) growth (at six-day intervals, by taking color photographs with a Nikon Coolpix 8400 digital camera), (ii) chlorophyll content (spectrophotometrical readings of DMSO crude extracts), (iii) chlorophyll a fluorescence emission of dark- and light-exposed samples (by means of a pulse-amplitude-modulated fluorimeter Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Germany), (iv) membrane damage (Sytox Green S-7020 stained cells observed with a confocal laser scanning microscope C1-si, Nikon, Tokyo, Japan). The presence of carbon nanotubes on the surface of both types of discs did not affect the cultures of *Trebouxia* sp. On the contrary, those derived from algae re-suspended in the CNT dispersions had lower chlorophyll content than the control, and most of their cells showed consistent membrane damage, although the photosynthetic efficiency, expressed by the F_v/F_m ratio, was not significantly affected. Surprisingly, no dose-dependent response was observed comparing the 3 different concentrations. The environmental implications suggested by these results are shortly addressed also on the basis of the most recent literature.

Keywords Carbon Nanotubes, Lichens, *Trebouxia*

Introduction

The potential of nanotechnology to bring benefits to many areas of research, industry and health has been largely recognized, which explains the increasing investments by governments and businesses all around the world. In 2012, the worldwide carbon nanotubes (CNT) production was estimated in 1000ton/year [1]. New materials and nanoproducts are being introduced, increasing the source of engineered nanoparticles to the environment. Since their discovery in 1991 [2], carbon nanotubes uses have been extensively explored. CNT are already being used as fillers for plastic panels to dissipate charge during spray painting, in electrodes of lithium ion batteries, and is also possible to buy a tennis racquet and bicycle frames made from composites containing CNT [3]. As a consequence of their structure and composition, some important characteristics of these nanoparticles are hydrophobicity, a very high surface area, and the ability to penetrate plant cells [4,5]. Nevertheless, little is still known about their environmental impact and ecotoxicology. Studies concerning carbon nanoparticles effects on aquatic organisms, as algae and invertebrates, and on higher plants have been published so far [6,7,8,9,10] with very controversial results. Positive effects as growth inducement [5,7] and also negatives effects as reduction of photosynthetic activity and cell death [8,9] are reported. Therefore, is a questionable matter whether those effects are secondary or indirect, due to aggregates formation and acumulation on cellular surface [8,9,10,11].

Thus, being the release of CNT in all environment compartments a reality, where its fate and behavior are largely unknown, this study aims to start an investigation on the use of lichens - classical indicators of atmospheric pollution -

as potential biomonitors of carbon nanotubes aerosols. As a first contribution to this project, a lichen photobiont - the coccoid green alga *Trebouxia* sp., isolated from the lichen *Parmotrema perlatum* (Huds.) M. Choisy - was exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes (f-MWCNT). The goals of this work were therefore to measure the CNTs effects in terms of chlorophyll content, membrane damage, growth and photosynthetic activity. This report is the first to describe the physiological effects of carbon nanotubes in a lichen photobiont.

Materials and Methods

Nanomaterials. Pristine multi-walled carbon nanotubes, MWCNT, purchased from Nanostructured & Amorphous Materials Inc., Houston, TX 77084, USA were 95% pure, with outer diameters between 20 and 30 nm, and lengths between 0.5 and 2 μm . In order to make the MWCNT soluble in water, the functionalized MWCNT-NH₃⁺ (Fig. 1) was prepared through.... Sample characterization was performed through ...

Biological material. The coccoid green alga *Trebouxia* sp was isolated from the lichen *Parmotrema perlatum* (Huds.) M. Choisy according to Yamamoto, 2002. After the isolation, photobiont cells were inoculated in petri plates containing solid 3 Nitrogen *Trebouxia* medium and maintained in a growth chamber at 20 °C, under a 14-h/10-h light/dark cycle (lighting conditions: 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Exposure set up. The algae cells were exposed to MWCNT-NH₃⁺ under two interaction conditions – re-suspended in a nanotube dispersion before inoculation and inoculated on acetate or glass fiber discs containing nanotubes on the surface – at 0.01, 1.0 and 100 $\mu\text{g/mL}$. For the first type of interaction, a solution containing CNT dispersions plus algae re-suspension were prepared for each concentration and left for 1h under constant shaking (120 rpm). The pH was measured before and was not altered. Then, part of this solution was inoculated on 'clean' acetate or glass fiber discs through vacuum filtration. For the second type of interaction, the CNT dispersions were previously deposited on the discs surface through vacuum filtration (essential to obtain a homogeneous distribution), and left to dry inside a sterile hood at room temperature and under UV light. Then, part of the algae suspension (without CNTs) were inoculated on these discs. The algal density of the initial re-suspension filtrate on both discs and types of exposition calculated using a sedimentation chamber was equal to 1.8×10^5 cel/mL. All these inoculation and re-suspension procedures were performed inside a sterile hood, and every material was previously autoclaved at 121°C for 15 min to avoid contamination. After the inoculation, the discs – one acetate and one glass fiber for each type of interaction - were maintained inside a growth chamber for 21 days at optimal conditions in closed petri plates, on solid 3 Nitrogen *Trebouxia* medium, together with controls, i.e. other cultures obtained from the original liquid suspension, not exposed to MWCNT-NH₃⁺. All physiological analyses were performed after 21 days. Each treatment was replicated six times.

Growth. Monitored at six-day intervals, by taking color photographs with a Nikon Coolpix 8400 digital camera attached to a stereomicroscope and with a Canon PowerShot S5IS.

Chlorophyll content. The discs were directly extracted in the dark for 1 h at 65°C in 1.5 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO). After cooling to ambient temperature and centrifugation at 10,000g for 20 min at room temperature, the absorbance of the extract was determined at 750 nm with a spectrophotometer to ensure that turbidity was always less than 0.01. The absorbance of the extracts was then read at 665, 649 and 480 nm to assess chlorophyll content and the total carotenoids (Wellburn 1994). To utilize the linear portion of the response curve, extracts from discs with very high cell densities (absorbance at 665 nm higher than 0.8) were diluted with fresh DMSO to fall into the absorbance range 0.2–0.8. To calculate the concentration (expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$) the equations of Wellburn (1994) were used.

Photosynthetic activity. Chlorophyll a fluorescence emission (Chl_aF) of dark- and light-exposed samples was measured by means of a pulse-amplitude-modulated fluorimeter Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Germany. Measurements were taken on discs that were removed from the agar, cuted in a half and kept inside a Petri plate covered with humid paper upon a microscopy glass, in order to avoid desiccation stress. Every Petri containing a disc were dark-adapted by covering them, completely, for 30 min with a piece of black velvet. The measuring fiber optic (length: 100 cm; active diameter: 5.5 mm) was positioned at 90° over the sample with the aid of a clip covered with a black neoprene ring 1 mm thick. The minimal F_0 and maximal (F_m) fluorescence values were registered in dark-adapted samples as well as the maximum quantum yield (F_v/F_m), which characterizes the potential quantum efficiency of photosystem II (PS II).

Membrane damage. Sytox Green S-7020 stained cells observed with a confocal laser scanning microscope C1-si, Nikon, Tokyo, Japan. Discs were gently removed from the agar, pieces of a quarter were cut and placed on a microscope glass and dark incubated for 15 min with 30 μL of 5 μM Sytox Green dead cell stain S-7020 water solution (Molecular Probes, Eugene, OR) in a closed Petri dish lined with absorbant paper soaked with distilled water. Each glass slide was immediately observed with a confocal laser scanning microscope (C1-si, Nikon, Tokyo, Japan)

equipped with an argon ion laser exiting at 488 nm. Signal from the excited dye was acquired through a 515/30 nm band-pass filter, while emission of chlorophyll autofluorescence was acquired through a 650 nm long pass filter. The intensity of the laser was set at 30%. Acquisitions were elaborated with the Nikon EZ-C1 FreeViewer software (Nikon, Tokyo, Japan) and with the freeware suite ImageJ (National Institute for Health, Bethesda, MD). This method allows the determination of cell viability, because Sytox Green will not cross intact membranes, but will easily penetrate compromised membranes and binds the nucleic acids becoming fluorescent, with a maximum emission at 523 nm.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney test, where values of $P \leq 0.01$ were considered significant. Each treatment was replicated six times. Data are presented as mean \pm SD (standard deviation).

Results and Discussion

Preliminary observations at the optical microscope have shown the CNT agglomerates closely attached to the algae cells in aqueous suspension. This 'close contact' was expected because it was observed in other studies regarding algae and CNT exposition [8, 14], but also because the formation of clusters is a particular characteristic of *Trebouxia* sp cells. Previous studies have demonstrated "indirect effects" caused by the formation of this type of algae-CNT agglomerates [8]. It is important to mention that different from the already studied algae, *Trebouxia* sp is an aerial alga, which grown in solid media. In this sense, it was possible (and rather logical considering the "lichenized alga") to expose it to the MWCNT in two different ways - deposited, simulating a contact due to a deposition event, and re-suspended in an aqueous dispersion. Thus, it was expected to observe differences on the physiological responses regarding the concentration range and type of exposition, even though after this previous observation of the algae-CNT agglomerates in different concentrations.

CNT analysis

Growth and Chlorophyll Content

The CNT effects on growth were first verified by taking photographs records every week. In Figure 1 is possible to observe that the discs on the left side of the Petri present, clearly, less cellular amount than the ones on the right side. This pattern was verified for all three concentrations tested. The algae that was re-suspended inside a CNT dispersion (discs A and B) grow in a smaller rate than the one inoculated on the discs containing CNT on their surface (C and D).

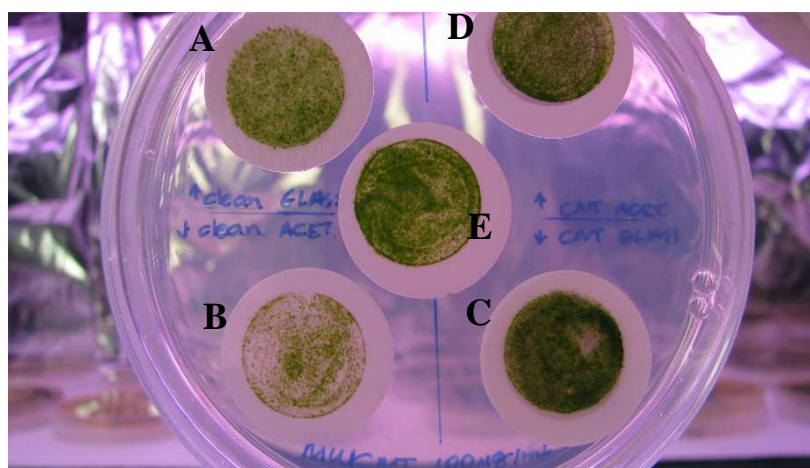


Fig. 1 – Differences on growth rate of *Trebouxia* sp culture exposed to 100 μ g/mL of MWCNT-NH₃⁺ observed on the second week after inoculation. A, B: cultures re-suspended in the CNT dispersion before inoculation (A, glass filter and B, acetate membrane). C, D: cultures inoculated on filters/membranes with CNT previously deposited on the surface (being C, glass filter and D, acetate membrane). E: control culture on acetate membrane, not exposed to CNT.

The chlorophyll content analysis, which in this case, is an indirect measure of the culture biomass, was measured after 21 days of growth and confirmed the previous observations, as shown in Figure 2.

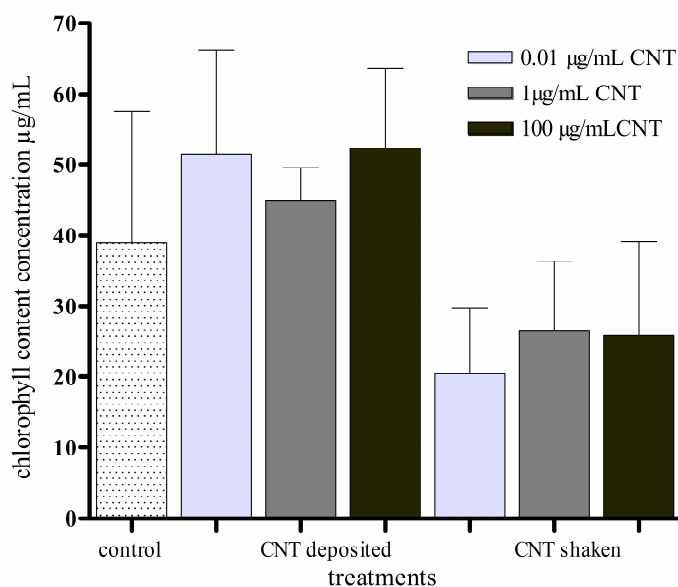


Fig. 2 Effect of carbon nanotubes exposure on chlorophyll content of *Trebouxia* sp cells for both types of exposition and CNT concentration range.

CNT exposition did not influence the chlorophyll content in a dose-dependent manner. Nevertheless, a notable effect on the chlorophyll content was observed comparing both types of exposition: cells that were re-suspended inside a CNT dispersion have less chlorophyll content than the cells that were inoculate on a filter containing CNT on acetate membrane surface. The same pattern was observed for the glass filter and for a different set of samples using a different alga population.

Photosynthetic activity

The photosynthetic activity was not significantly altered by any treatment. No statistical differences were found on the Fv/Fm values between the exposed and control samples, being the average in the controls equal to 0.716 and for the re-suspended samples exposed to the highest concentration 0.650 (Fig.3). This values show agreement with previous studies regarding healthy *Trebouxia* sp cells [15]. Although a visible shadow was created when depositing large amounts of CNT on the filter's surface (it turned to a gray color), unexpectedly, this disturbance did not seem to alter the efficiency of the photosynthetic apparatus. Another hypothesis is related to *Trebouxia* sp cells ability to recover from an earlier stress condition. As this is an analyses of a population that developed for 21 days, this results may be also related to the population dynamic.

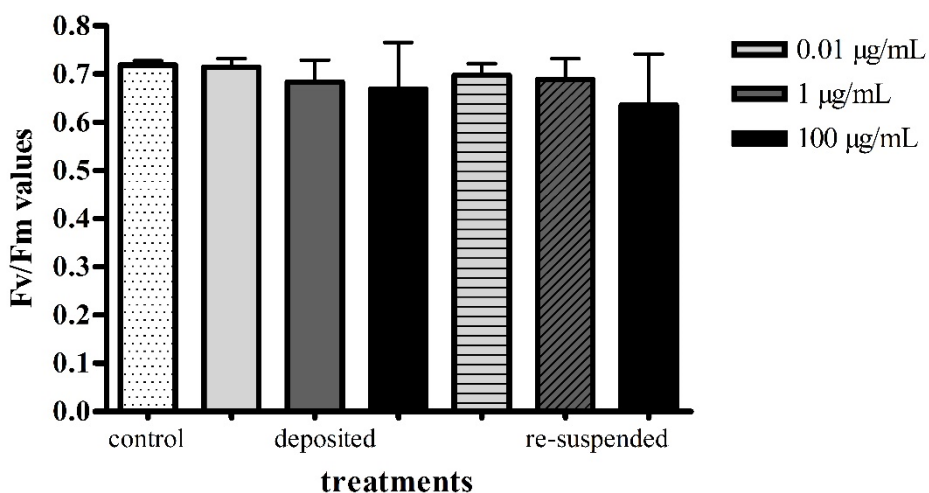
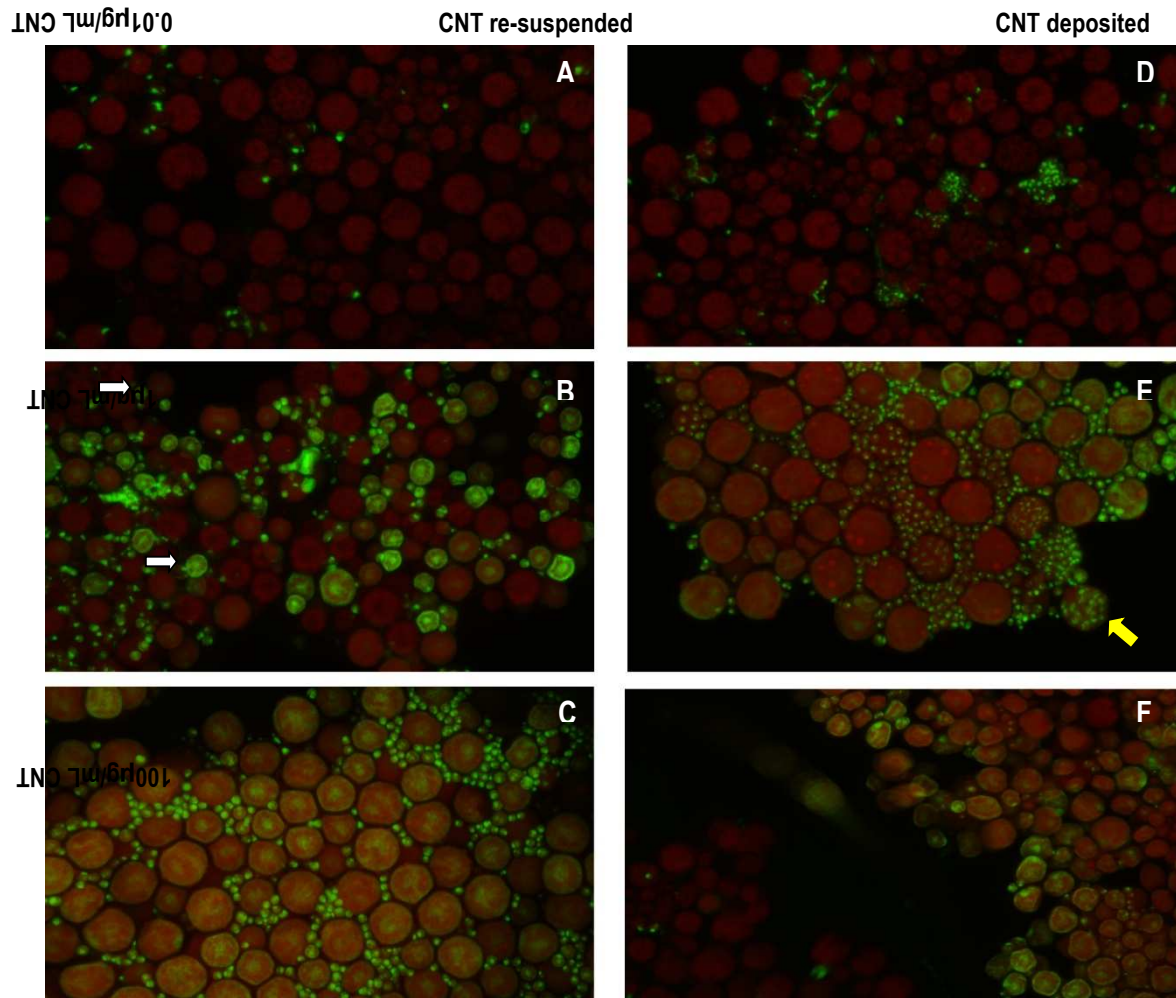


Fig. 3 - Effect of carbon nanotubes exposure on photosynthetic efficiency of *Trebouxia* sp cells for both types of exposition and CNT concentration range

Membrane damage

Histochemical observations performed through confocal microscopy of Sytox Green stained cells shows membrane damage in both exposition types. In Figure 4 is possible to notice that *Trebouxia* sp cells exposed to 0.01 µg/mL (images A and E) presented almost no damage, images are very similar to the control (image H). At the medium and highest concentration (images B, C and F, G) the green stain was internalized demonstrating membrane damage. Differences between the exposition type – CNT deposited and CNT re-suspended – are not clear, although variances were observed accordingly to the cell developmental stage in every sample analyzed. The smaller cells (autospores) and the mother cell (arrows in images B and E, respectively) appeared in all samples as cell types more damage. This is probably due to the differences on cell wall thickness, as the layers that constitute *Trebouxia* cell wall are not completely formed in the autospores and about to break (to liberate the autospores) in the mother cell (see more information in Peveling and Konig, 1985). In this sense, these developmental stages are more sensible to effects related to aggregates formation, or mechanical contact, for instance. Also, it was possible to observe a remarkable presence of healthy cells among the damaged group. This is clear in image F (Fig. 4) where in one side we have the green and damage cells and in the other the red and healthy ones, but this pattern was observed in all samples where damaged cells were presented. It appears that *Trebouxia*'s lifecycle was not discontinued and, as mentioned before, the population dynamic was not severely harmed.



control

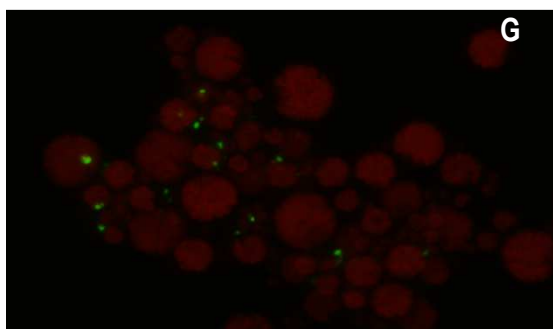


Fig. 4 – Confocal Images of *Trebouxia* sp cells stained with Sytox Green S-7020 observed in 21 days after treatments with 0.01 µg/mL (A, D), 1 µg/mL (B, E), 100 µg/mL (C, F) of carbon nanotubes dispersions and in the control (G). Image B, arrows: free autospores. Image E, yellow arrow: mother cell with autospores.

Conclusions

Changing the exposition pattern, substrates and concentration of CNT available to the algae cells the present work investigates the functionalized carbon nanotubes effects on a lichen photobiont. In summary, we showed that the effects of f-MWCNT on *Trebouxia* sp (isolated from *P. perlatum*) can be related with the condition that this nanoparticle interacts with the cell. Negative effects as reduction of growth, chlorophyll content and membrane damage are reported. Nevertheless, no dose-response effect was observed and the photosintetic activity was not affected in both exposure sets (deposition and re-suspension).

Although some negative effects were observed in this study, the functionalised multiwalled carbon nanotubes did not damage some of the main physiological functions of *Trebouxia* sp cells, being the alga population able to recover from the negative effects described here.

Acknowledgments

Thanks to the CAPES Foudation, Ministry of Education of Brazil (grant PDSE nº 8822-11-5) for financial support.

References

1. Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in europe and the world. *J. Nanopart. Res.* 2012, 14, 1-11.
2. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991; 354: 56-58.
3. Alexander J. A. Carbon Nanotube Structures and Compositions: Implications for Toxicological Studies. IN: Nanotoxicology: characterization, dosing and health effects edited by Nancy A. Monteiro-Riviere, C. Lang Tran. New York: Informa Healthcare USA; 2007.
4. Liu Q, Chen B, Wang Q, Shi X, Xiao Z, Lin J, et al. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Lett* 2009; 9(3):1007–10.
5. Khodakovskaya M, Silva K, Biris A, Dervishi E, Villagarcia H. Carbon Nanotubes Induce Growth Enhancement of Tobacco Cells. *ACS Nano* 2012; 6 (3): 2128–2135.
6. Baun A, Hartmann N. B, Grieger K, Kusk K. O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology* 2008; 17: 387-395.
7. Ghodake G, Seo YD, Park D, Lee S. Phytotoxicity of carbon nanotubes assessed by Brassica Juncea and Phaseolus Mungo. *J Nanoelectron Optoelectron* 2010; 5(2):157–60.
8. Schwab, F.; Bucheli, T. D.; Lukhele, L.; Magrez, A.; Nowack, B.; Sigg, L.; Knauer, K. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45: 6136-6144.
9. Begum P, Ikhtiar R, Fugetsu B. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. *Carbon* 2011; 49: 3907-3919.
10. Wei, L. P.; Thakkar, M.; Chen, Y. H.; Ntim, S. A.; Mitra, S.; Zhang, X. Y. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Aquat. Toxicol.* 2010; 100: 194–201.
11. Basiuk, E.V.; Ochoa-Olmos, O.E., Mora-Estrada, L.F. Ecotoxicological effects of carbon nanomaterials on algae, fungi and plants. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2011; 11: 3016-3038.

12. [Yoshimura I](#), [Yamamoto Y](#), [Nakano T](#), [Finnie J](#). Isolation and Culture of Lichen Photobionts and Mycobionts. *Protocols in Lichenology, Springer Lab Manuals* 2002, pp 3-33.
13. Wellburn A R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol* [1994](#); 144: 307-313.
14. Matorin D N, Karateyeva A V, Osipov V A, Lukashev E P, Seifullina N Kh, Rubin A B. Influence of Carbon Nanotubes on Chlorophyll Fluorescence Parameters of Green Algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nanotechnologies in Russia* 2010, 5(5-6): 320-327.
15. Tretiach M, Bertuzzi S, Candotto Carniel F. Heat Shock Treatments: A New Safe Approach against Lichen Growth on Outdoor Stone Surfaces. *Environ Sci Technol* 2012; 46(12): 6851-6859.
16. Peveling, E; Konig, J. Differences in formation of vegetative cells and their walls in Trebouxia and Pseudotrebouxia as further evidence for the classification of these genera. *Lichenologist* 1985; 17(3): 281-287.

Physiological changes of the lichen *Parmotrema tinctorum* as result of carbon nanotubes exposition

Camila de O. Viana^{1*}, Raissa P. Vaz¹, Abraham Cano[†], Adelina P. Santos[‡], Luiz G. Cançado[†], Luiz O. Ladeira[†], Ary Corrêa Junior^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, , Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 31270-901, Brazil; [†] Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 31270-901, Brazil; [‡] Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN), Belo Horizonte, MG, CEP 30123-970, Brazil

Abstract. Carbon nanotubes (CNT) is one of the more abundant nanomaterial produced in the world. Therefore, it is desirable to access the effect of its presence in all environment compartments. This study aims to verify the potential use of lichens - classical atmospheric pollution indicators - as biomonitors of carbon nanotubes aerosols. In order to examine cause-effect relationships preserving environmental microclimatic parameters, the lichen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale was transplanted to open top chambers where aerosols of CNT were daily added. Physiological parameters such as: cell viability, photosynthetic efficiency, cell permeability as well as nanoparticle internalization were assessed. Carbon nanotubes exposure led to reduction on the cell viability of *Parmotrema tinctorum*. The treatment with 100 µg/mL of MWCNT-COOH resulted in an intracellular ion leakage, probably due to changes in membrane permeability. No alterations on photosynthetic efficiency were found and carbon nanotubes entrapment and internalization into the lichen thallus were observed. Short term exposition of CNT produced measurable physiological changes in *Parmotrema tinctorum* lichen. This point out the possibility to use lichens as models to assess the environmental impact (air related) of engineered nanomaterials. The long term effects of CNT exposition are still to be accessed.

Keywords. Lichens, nanoecotoxicology, ecotoxicology, carbon nanotubes

Introduction

Due to the innumerable application possibilities, the production and commercialization of nanomaterials is increasing. The responsible use of this technology requires a better understanding of the nanomaterial life cycle and therefore, generates the necessity of the development of assessment protocols for environmental impact¹. The potential environmental, health and safety (EHS) impacts of the technology are however, not yet well-established^{2,3}. One of the main challenges in nanoecotoxicological research is the choice of organisms and endpoints to be assessed in a realistic scenario^{3,4}. To this date, several reports^{5,6,7} have been published focusing on the nanoparticles effects on aquatic organisms. Cytotoxicity due to nanomaterials is also well described, but there is a lack of data describing the effects of nanomaterial air exposition in the biota.

Carbon nanotubes are virtually weightless and able to stay for a long time in the air, generating aerosols with high potential of dispersion and therefore, increasing the chance of exposition³. Atmospheric exposure experiments (essential for inhalation studies, for instance)² is particularly challenging due to technical difficulties and cost involved in simulating real-life exposures.

Aiming in the development of environmental risk assessments models, we investigated the effects of carbon nanotubes aerosols in lichens, classical biomonitors of atmospheric pollution. Having its first publication date to 1866 (Nylander), lichen forming fungi were theme of several^{9,10,11,12} biomonitoring studies, being recently subject of an international standard protocol for environmental exposure¹³. Lichens are symbiotic organisms where a photosynthetic partner (green algae or cyanobacteria) and a mycobiont (usually an ascomycete) live together as a unique morphology called thallus. Lichens are the model of choice to assess atmospheric condition, mainly, due to their nutritional air dependence and absence of excretory mechanisms. Two approaches are applied when lichens are used as biomonitors: the "active" - through transplant techniques - or through a "passive" survey - using data on the lichen community diversity in a determined area. The lichen transplant technique, selected for this study, is commonly used to assess biological effects of atmospheric contaminants. It is a versatile tool that can be applied in different exposure scenarios with a multitude of contaminants, evaluating physiological changes resulting from exposure.

Our main objective was to analyze the possible use of this organism as a biomonitor of carbon nanotubes aerosols. The goals of this work were: to measure CNTs effects in terms of lichen cellular viability, membrane damage and photosynthetic activity. This report is, as far as we know, the first to describe the physiological effects of carbon nanotubes in lichens.

Materials and Methods

Lichen sampling and preservation. The epiphytic foliose lichen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale was selected for this study because of its good availability, well established use in biomonitoring studies ¹²(Kaffer et al, 2012...) and easiness harvest and identification. Sampling was carried out at Serra do Cipó National Park (19°15'S and 43°33'W), far from known pollution sources, on October 2013. Whole thalli, measuring 7-10 cm of diameter, were detached from the substratum using a stainless steel knife. The material was put inside paper bags, to avoid mold formation, transported do the laboratory and carefully cleaned from foreign material and contaminants. Each thalli was divided (radial cuts) using a porcelain palette knife into 7-9 sections, with similar size and weight (approx. 40mg and 5cm²). Seven experimental groups containing at least five samples were formed (each group containing a section of each specimen), and kept inside Petri plates for 16h to dehydrated over silica gel. The Petri plates were then sealed and placed in plastic bags and the air was removed. Samples were kept at -20 ° C until the experiment execution.

Multi-Walled Carbon Nanotubes. Multi-walled carbon nanotubes (97.5 % pure, with outer diameters between 10 and 30nm, and lengths between 10 and 60 µm) were synthesized by chemical vapour deposition using Fe, Co and MgO as metallic catalysts and ethylene as carbon precursor, under atmospheric pressure and temperatures between 600-1000° C at the Nanomaterials Laboratory at UFMG. In order to make the MWCNT soluble in water, -COOH moieties were generated in 100mg of the pristine nanomaterial by heating in a microwave oven during 30min, in 5 min cycles in an 1:1 mixture of H₂SO₄/HNO₃ (adapted from Datsyuk et al, 2008). After functionalization, the mixture was cooled at room temperature and washed, through centrifugation and filtration, until a neutral solution was reached. The solid product was dried in an oven at 80 °C for 24 h. Sample characterization was performed through scanning electron microscopy (SEM), Raman spectroscopy and thermogravimetric analysis (TGA). SEM images were obtained in a FEI scanning electron microscope fitted with a cannon FEG (Field Emission Gun), model Quanta 200. Raman data was

acquired using an Andor Technology Sharmrock Sr 303i spectrometer in the backscattering configuration, through a 60x immersion oil objective. The light excitation was provided by a 561.4 nm He-Ne laser source. For the thermogravimetric characterization data the equipment model SDT2960 from TA Instruments (USA) was used.

Preliminary assessment – Cell viability. A preliminary exploratory experiment was conducted by transplanting lichen samples, kept in the laboratory at ambient temperature, daily treated for 3 days with 9 different concentrations of MWCNT-COOH water dispersions – 0.001 to 100 µg/mL - and a water control. After the exposure period, the samples were rapidly washed with 5mL of distilled water. Then, the superior cortex (always from the thallus edge), was carefully removed using a stylet¹².

Photobiont cells (located in the superior cortex) were stained using Neutral Red and live, dead and plasmolyzed cells were counted¹⁵. Neutral Red is a non-fluorescent dye that passes through intact plasma membranes becoming accumulated in the cytoplasm. In contrast, dead cells report no uptake¹⁶. Then, the IVF (Index of Photobiont Vitality) was calculated as described in Kaffer et al (2012), applying the formula $IVF = [V(P1/2)/M(P1/2)]$ where, V= number of live cells, PI = number of plasmolyzed cells and M = number of dead cells.

Open top chamber exposures. In order to examine cause-effect relationships in a more realistic environmental approach, the lichen samples were transplanted to open top chambers (OTCs). Two exposure set ups were performed, one using a functionalized carbon nanotube sample (MWCNT-COOH dispersed in distilled water) and another using the pristine nanomaterial (MWCNT as a dry aerosol). For the first set up, lichen thallus were carefully placed inside an open top chamber and daily sprayed with 0.01, 1.0 and 100 µg/mL of MWCNT-COOH water dispersion. Samples were treated during 15 days, together with positive (activated carbon at 100 µg/mL) and negative (water) controls.

For a second set up, lichen samples were exposed to an enriched atmosphere of 0.01, 0.1 and 0.5 gr of MWCNT per m³ during 7 days; and, another group was continuously treated during 21 days. These samples were exposed in an open top chamber coupled with a suspension unit where CNT were daily added. In a second chamber, control samples were kept in the same environmental conditions.

The OTCs were made of a translucent material, and comprises the exposure chamber, the ventilation system and the chamber's top, as show in Figure 1. The exposure chamber is the OTC's main structure, where the

lichen samples are placed. A ventilation system directly connected to this chamber continuously provides fresh air. The suspension unit, specially developed to this work, is connected by a tube to the OTC's ventilation system. This unit has a metallic structure with a cylindrical air turbine inside, a tube for the carbon nanotubes entrance and another tube for the formed aerosol exit.

All samples were placed facing south, as they normally grow in the field, and the treatment occurred early in the morning, when a higher relative humidity is observed. Temperature and relative humidity were monitored inside both chambers and double-sided carbon microscopy tapes were placed inside the OTCs (i. e., side the lichen samples) to confirm CNT approach and distribution inside the chamber. Scanning Electron Microscopy images were taken from the thallus surface and shaved cortex after the exposure. Considering its relevancy in an environmental risk assessment context, this experimental design aimed to simulate a more realistic dry exposition event. After each treatment, cell membrane damage, cellular location of target elements and photosynthetic efficiency were analyzed as follows.

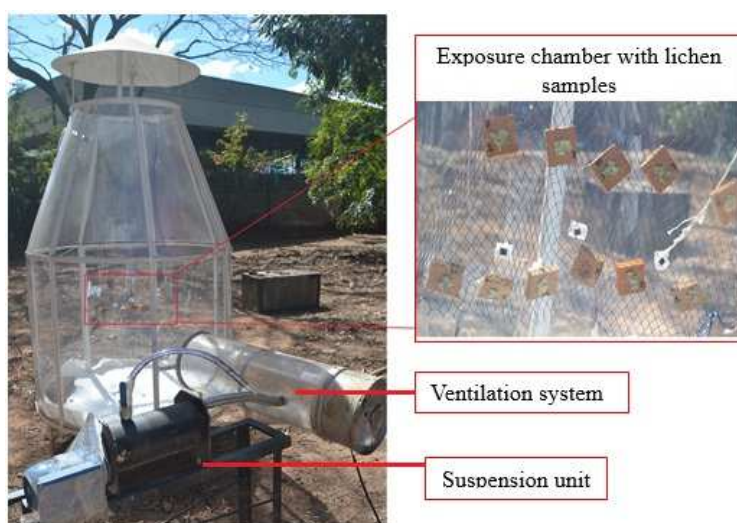


Figure 5 – Image of open top chamber (OTC) coupled with suspension unit

Cell membrane damage. Damaged membrane cells had its permeability altered, resulting in electrolyte leakage, mainly K^+ ions. To verify the integrity of the lichen cells membrane, a piece of the lichen thallus was submerged in 25 mL of deionized water, kept in agitation for 1h (at $20^{\circ}C$) and the variation of electrical conductivity was measured (adapted from Munzi et al, 2009).

Cellular location of target elements. The cellular location and concentration of Ca, Co, Fe, Mg, Mn and Zn was determined using the sequential elution technique adapted from Brown and Brown (1991) and Figueira et al (1999). The distribution patterns of essential elements is a way to assess lichens' physiological condition. The water used for the membrane permeability protocol was stored for elemental analyses to estimate the soluble fraction present on the lichen surface. Samples were dry at 80^o C for 16h, and the dry weigh was determined. Then, the intact thalli were continuously agitated in 5mL of NiCl₂ (20mM) solution for 30min, in order to remove the elements bound to the cell wall. To determine the elemental composition of the intracellular fraction, samples were agitated in 5mL of HNO₃ (1M) solution for 3-4h until complete digestion. All the three fractions – water, NiCl₂ solution and HNO₃ solution – were analysed through ICP-AES at the Atomic Spectroscopy's Laboratory at CDTN-Brazil to quantify the target elements.

Photosynthetic efficiency. Chlorophyll "a" fluorescence emission (Chl_aF) of dark-exposed samples was measured by a pulse-amplitude-modulated fluorimeter Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Germany. The maximum quantum yield (F_v/F_m), which characterizes the potential quantum efficiency of photosystem II (PS II), was measured on dark adapted thalli that had been maintained for 48h inside Petri plates covered with humid paper upon a microscopy glass, in order kept the samples fully hydrated, avoiding drought stress.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using One Way Repeated Measures Variance Analyses of Variance (ANOVA) at Sigma Plot 13 Software, where values of P ≤ 0.05 were considered significant. Each treatment was replicated six times. Data are presented as mean ± SD (standard deviation).

Results and Discussion

Multi-Walled Carbon Nanotubes Characterization

Carbon nanotubes physical-chemical characterization is an essential step in any project dealing with the material, ensuring the correct causality analyses of the experiments.

The sample was considered of high purity based on thermogravimetric analyses (Fig. 2A). TG curve shows a single stage of decomposition, between 500 and 600 °C and, the DTG depict the presence of only one peak with a loss of nearly 98% of the initial mass after analyses. The residue of 2.5% indicates the presence of minor impurities, probably remains of synthesis catalyts (MgO, Co and Fe).

Scanning Electron Microscopy images from the pristine and functionalized samples showed high aggregation of carbon nanotubes, which are commonly grouped together forming bundles and clumps. Tubes diameter, varies between 10 and 30 nm with variable lengths (Fig 2C). Nanotubes with more than 50 μ m in length were observed.

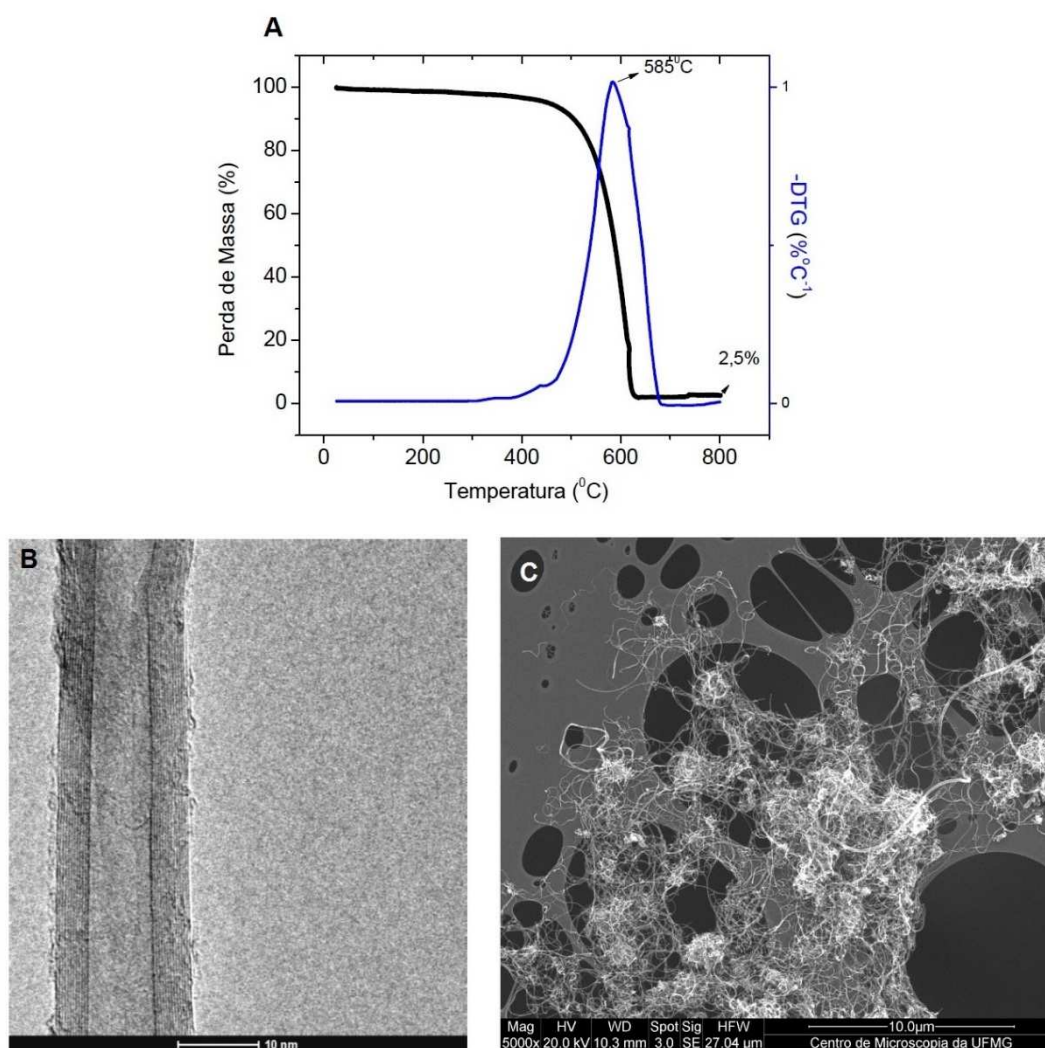


Figure 2 - Sample physical-chemical characterization. (A): Thermogravimetric analyses of the sample. A single peak at 585° C was observed with a 2.5 % (w/w) residue left after treatment. (B): electron microscopy analyses showing a single multi wall CNT with aproximately 15 nm diameter. (C): CNT are normally agglomerated and impurities are seldom observed.

The molecular disorder degree and presence of other carbonaceous material was analysed by Raman Spectroscopy²⁰. In Figure 3, it is possible to observe the three characteristic spectral regions of CNT: the D (around 1336 cm^{-1}) and D' (around 1620 cm^{-1}) bands - associated with the sample structural disorder - and the G band (around 1577 cm^{-1}) - relative to the tangential vibration modes of graphite. Furthermore, the CNT

disorder degree was estimated by the relative intensities of D and G bands (I_D / I_G). After functionalization, the I_D / I_G ratio increased, reflecting the tubes structural change due to the carboxyl group's addition on the tubes surface.

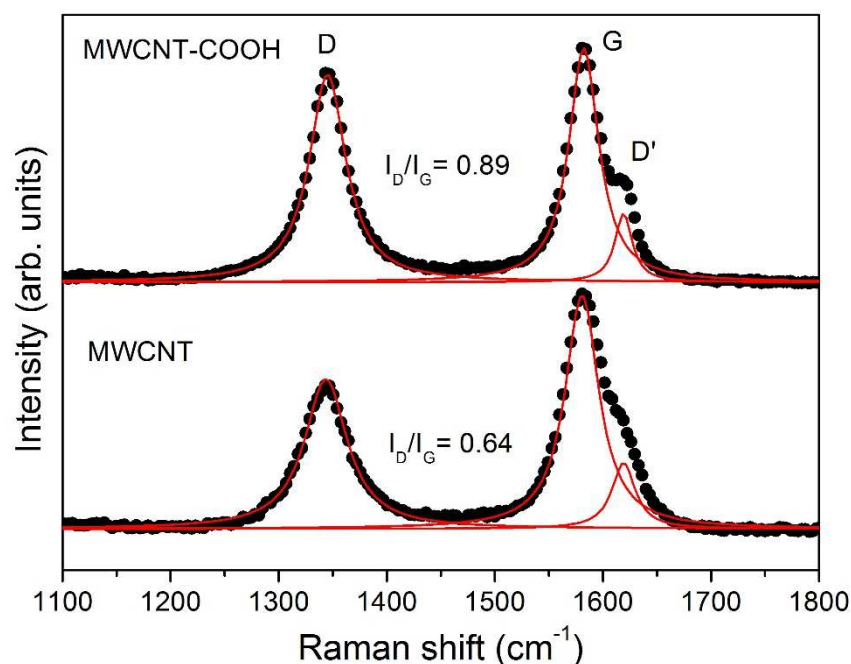


Figure 3 - Raman spectra of pristine (MWCNT) and functionalized (MWCNT-COOH) carbon nanotubes

Investigations on MWCNT and lichen thallus interaction

Raman Confocal images and Scanning Electron micrographs were used to investigate the carbon nanotube deposition and internalization on the lichen thallus. Preliminary, the MWCNT ability to penetrate the lichen thallus, and approach the photobiont cells was analysed obtaining a confocal Raman image followed by punctual spectra acquisition. It is possible to observe the presence of MWCNT characteristic spectra (in accordance with the performed sample characterization) on the photobiont area. The D (~1295 cm⁻¹), G (~1653 cm⁻¹) and G' (~2933 cm⁻¹) bands were detected on the cell area, as shown in Figure 4.

Control samples did not present similar peaks in this spectral region. In addition, points outside the cell also did not present the nanotubes characteristic Raman spectra. These findings are in agreement with the work of Khodakovskaya et al (2012) where the presence and relative intensity of the G band was associated with the existence of MWCNT inside plant cells.

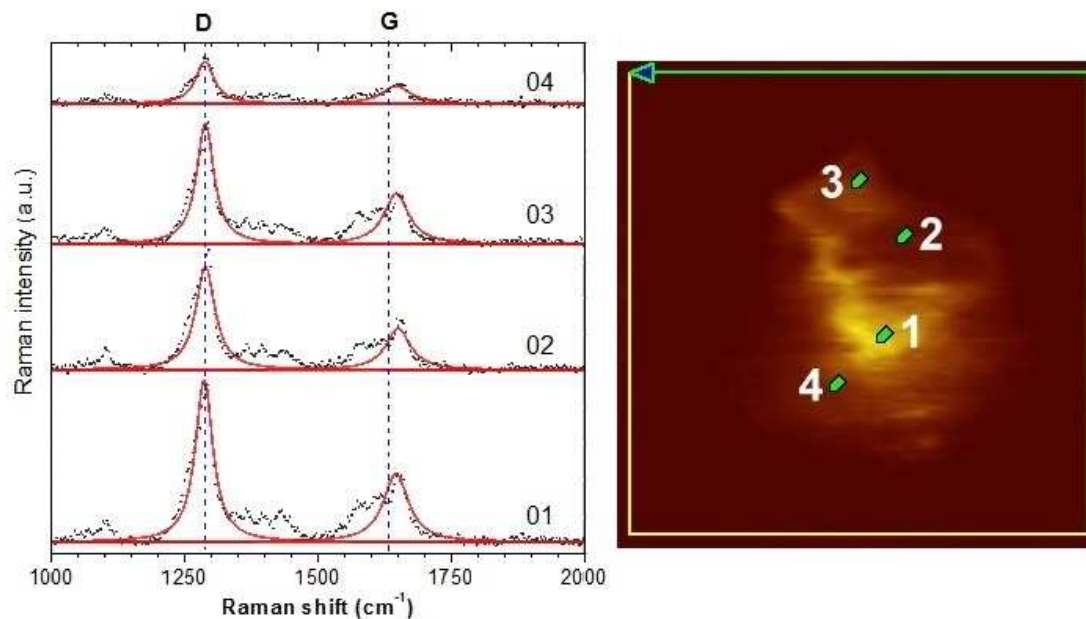


Figure 4 – Raman spectra obtained through Raman Confocal Microscopy in four different points of *Parmotrema tinctorum*'s photobiont cell. The nanotube-specific bands D and G were detected in all four points.

The MWCNT aggregation and entrapment on the cell wall region, one of the principal CNT toxic mechanisms (already reported by Wei et al, 2010 and Schwab et al, 2013) was confirmed by SEM of the photobiont surface (images C and D in Figure 5).

Parmotrema tinctorum's upper cortex was also observed through SEM after MWCNT dry exposure. As shown in Figure 5 (A), it was possible to observe carbon nanotubes trapped on the lichen surface, confirming that the aerosol exposition was effective, resulting in dry deposition as expected. Unfortunately a quantitative estimation of CNT on the thallus is virtually impossible to be achieved. The development of measuring protocols for environmental detection of nanoparticles is one of the major challenges facing researchers concerned with nanoecotoxicology and reduces the strength of our conclusions. Carbon nanotubes aggregation on the lichen thallus after a wet exposition (with MWCNT-COOH) is shown in (B). Several studies^{18,24,25} suggest that lichens are effective biosystems for entrapment of particulate airborne matter, mainly due the presence of considerable intercellular spaces between the fungus hyphae and the photobiont^{26,27}. Besides these facts, the CNT entrapment on *P. tinctorum* can be also due to the surface chemical composition of this specie, which have - as reported by Oliveira et al (2009) - high amounts of chelating agents, such as atranorin and lecanoric acid.

Although the specific location of the carbon nanotube cannot be completely assured, these results demonstrate the lichen ability to retain and internalize this nanoparticle in a realistic scenario.

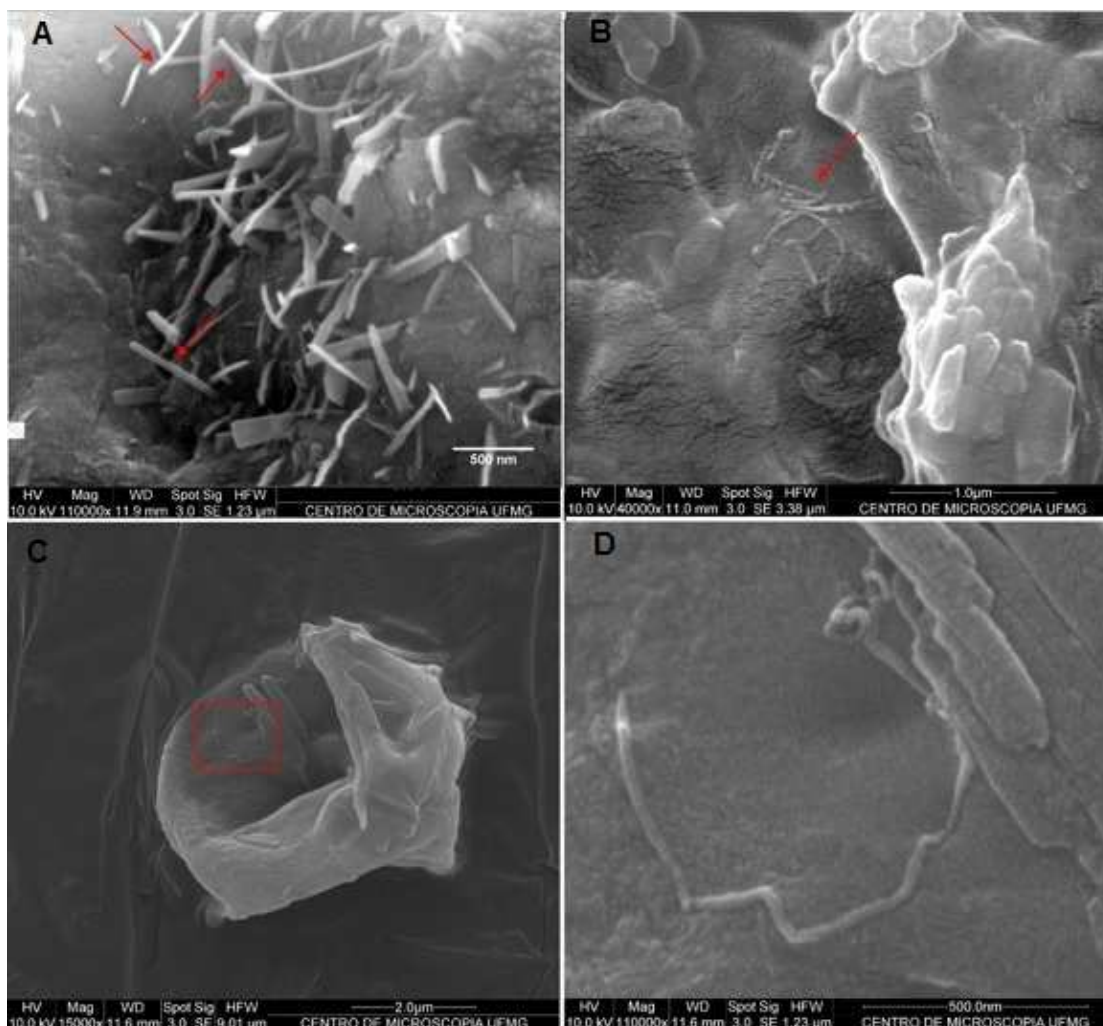


Figure 5 - SEM images of *Parmotrema tinctorum* surface and photobiont interaction with carbon nanotubes (arrows). Images taken after dry exposition (A), wet exposition (B) and the photobiont cell (C and D) shaved from the lichen' cortex after a wet exposition event.

Effects of MWCNT exposition on cell viability

The lichen sensitivity to MWCNT exposition was first assessed through live, dead and plasmolyzed cell counting followed by the Index of Photobiont Vitality (IFV) calculation. Significant differences ($p \leq 0.02$) on IFV values were estimated comparing control (water) and MWCNT-COOH treatments. Lichen photobiont vitality was reduced due to the carbon nanotubes exposure (Figure 6). However, dose-response effect was not clearly observed: the comparison between treatments shows significant correlation ($p \leq 0.05$) when the concentration increases in a factor of 100. However, no significant differences in the photobiont vitality were

observed by increasing a factor of 10 in the nanotubes concentration, when comparing 100 and 10 $\mu\text{g/mL}$ treatments. These data are in accordance with a similar study considering CNT effects on algae cells vitality⁷, where the cell viability was also altered by CNT exposition, but in a non-concentration dependent manner. Considering that our main objective is to evaluate the potential use of lichens for biomonitoring purposes, the organism sensitivity to the exposition is an essential question. *Parmotrema tinctorum* is known for its sensitivity to different pollutants²⁹, a characteristic related with its foliose nature, where all the superior cortex surface is available for airborne pollutant accumulation¹². Our study is the first to report *P. tinctorum* sensitivity to carbon nanotube exposure. As a dose response correlation was not observed, the limit of detection of the method could not be determined.

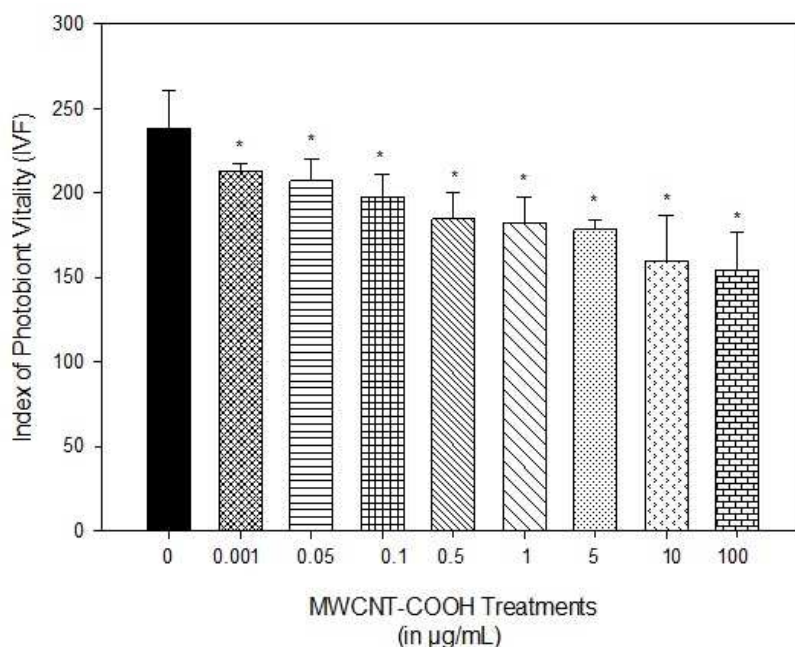


Figure 6 – Effect of MWCNT-COOH exposition on the Index of Photobiont Vitality (mean \pm SD, *significantly different from control)

Cell membrane damage

P. tinctorum membrane does not have its permeability altered after 7 days or 21 days of exposure with pristine MWCNT. The multi-exposure (21 days) samples presented the higher conductivity values. This could be due to a short exposure effect related to the transplant technique (as reported by Tretiach et al, 2007). For the second exposure set up (B), there is a statistically significant difference among the control and 100 $\mu\text{g/mL}$ MWCNT-COOH and activated carbon (positive control) treatments ($p\leq 0.05$). Although the

treated groups mean values did not show significant differences between themselves, the ion leakage increases in a direct relation with the concentration of functionalized carbon nanotube.

A direct comparison of the effects of pristine (Figure 7A) versus functionalized CNT (Figure 7B) cannot be evaluated due to the inherent differences on experimental conditions. However, knowing that lichens are poikilohydric organisms, where the water availability is directly related to their metabolism^{31,32}, it is possible to hypothesize that the treatment with functionalized carbon nanotube (dispersed in water) is more likely to result in metabolism activation. Beckett et al (1996), studying *P. tinctorum*, showed that approximately 20% of the water associated with the lichen thallus is in the intercellular spaces, and 5% in small cell wall pores (5-10nm). Considering this water distribution pattern, the samples direct watering with a MWCNT dispersion, would eventually allow the MWCNT an easier access to the lichens' intercellular space. As shown by the characterization data, our MWCTN sample is highly diverse referring to the tubes dimensions in length and diameter. In this sense, the accumulation of these nanotubes in the *P. tinctorum* intercellular spaces, associated with its metabolically active status, could result in the reported cell membrane damage effects.

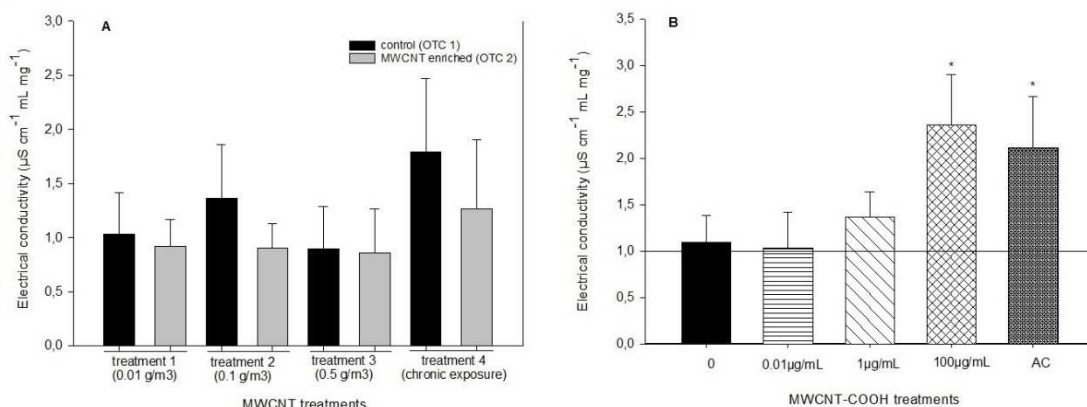


Figure 7 – Cell membrane damage in the lichen *Parmotrema tinctorum*, expressed as mean electrical conductivity (\pm SD, N=6). In (A) after MWCNT dry exposition and, in (B) after MWCNT-COOH wet exposition. (*significantly different from control)

Cellular location of target elements

The elemental analysis of the different extract fractions showed alterations in the cellular location of some elements after carbon nanotubes exposition, meaning that *Parmotrema tinctorum*'s mineral cycling dynamic was altered by the treatments. Calcium and magnesium presented a different distribution pattern comparing treated and control samples. As shown in Table 1, their intracellular concentration decreased in the treated samples and increased in the wall-bound fraction.

Table 1 – Changes in elemental distribution in *Parmotrema tinctorum* after MWCNT-COOH treatments, expressed as average values (in mg/L dry weigh)

ELEMEN T	0		0.01		1		100		AC	
	wall- bound	Intrace llular	wall- bound	intrace llular	wall- bound	intrace llular	wall- bound	intrace llular	wall- bound	Intrace llular
CA ²⁺	0.15	3.28	0.76	0.34	0.52	0.21	0.73	0.43	0.03	0.21
CO ²⁺	0.01	<0.1	0.02	<0.1	0.02	<0.1	0.02	<0.1	0.02	<0.1
MG ²⁺	0.05	0.21	0.06	0.13	0.07	0.11	0.07	0.11	0.06	0.10
MN ²⁺	0.03	<0.1	0.04	<0.1	0.03	<0.1	0.03	<0.1	0.02	<0.1
ZN ²⁺	0.13	0.06	0.12	0.03	0.12	0.03	0.15	0.06	0.17	0.03

This findings supports the cell membrane damage results, and permit to hypothesize that the membrane permeability was altered by CNT exposition allowing ionic loss. No significative alterations on the location of Co²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺ were found.

For the intercellular (water) fraction, the elemental concentration was inferior to the method's detection limit, equal to 0.1 mg/L, for all elements. The use of other analytical method for elemental quantification must be considered.

Photosynthetic efficiency

No differences in photosynthetic efficiency between the treatments and controls were observed with Fv/Fm values ranging from 0.525 and 0.638 (Figure 8).

The chlorophyll "a" fluorescent emission is a common method used in biomonitoring studies^{34,35,36} with lichens and plant biology surveys, because of its practicality and accuracy. Through the maximum photochemical quantum yield measurement, expressed by Fv/Fm ratio, the functionality of the photosynthetic process can be assessed. According to several studies with other photosynthetic organisms, carbon nanotubes exposure can influence photosynthetic efficiency, just by its blackening effect caused by the deposition of nanotubes on the surface^{7,37}. Although the deposition of CNT on *P. tinctorum* surface was observed, in our study this deposition did not altered the photosynthetic efficiency. Probably, as our experimental design aimed a more dynamic and realistic scenario, the CNT deposition was not sufficient to

cause a shadow effect. In addition, as a first assessment of the carbon nanotubes effects on a lichen physiology, we focused in a short-term exposure, future studies should investigate those parameters in a long-term exposure survey.

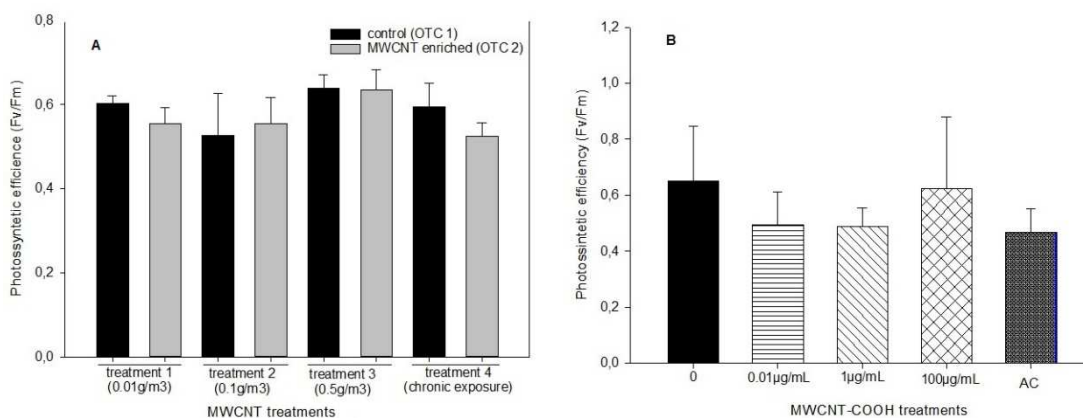


Figure 8 – Effects of carbon nanotubes exposition on photosynthetic efficiency of *P. tinctorum* (mean±SD, N=6). In (A) the results for MWCNT treatment and in (B) for MWCNT-COOH treatment.

Conclusions

In this first assessment of CNT effects on a lichen, *P. tinctorum* was exposed to three experimental designs and commonly used physiological parameters were measured. We could observe that the organism was sensitive to the treatments, but no toxic effect can be mentioned. The preliminary assessment, inside the laboratory, led to lichen vitality reduction, but no severe damage was reported, and no mortality was observed. Inside the open top chamber, the dry and wet deposition were simulated. In this scenario, only the water treatment with high amounts of MWCNT-COOH altered the lichen membrane permeability. An important parameter to assess the lichen health, the photosynthetic efficiency was not altered by MWCNT exposure, even after 21 days of continuous treatment. The investigations on the CNT-lichen interactions demonstrated evidences on CNT entrapment and internalization on the lichen thallus. Future studies should comprise the carbon nanotube bio-distribution evaluation, and a long-term exposure.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Email: camilaoviana@gmail.com; a_correa@icb.ufmg.br

Notes

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGMENT

Thanks to all members of the Laboratório de Fisiologia (UFMG), to the lichenologists Marcello Pinto Marcelli (Ibot/SP), Suzana Maria de Azevedo Martins, Marcia Kaffer (Zoobotanica/RS) and Mauro Tretiach (University of Trieste/Italy) for helpful discussions, assistance with physiology assessment protocols and lichen identification. To Lara Ambrosio, Bruno Pinheiro and Luz Alba for the help with field work. To the Brazilian agencies CNPq, Fapemig and CAPES (grant PDSE n° 8822-11-5) for financial support.

REFERENCES

- (1) *Nanomaterials: Case by case safety approach for breakthrough technology*; Press Release; European Commission: Brussels, 2012; http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-12-732_en.htm.
- (2) Nel, A.; Xia, T.; Meng, H.; Wang, X.; Lin, S.; Ji, Z.; Zhang, H. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Accounts of Chemical Research* **2013**, 46: 607-621.
- (3) *Nanosafety in Europe 2015-2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations*; Finnish Institute of Occupational Health: Helsinki, 2013; http://www.ttl.fi/en/publications/Electronic_publications/Nanosafety_in_europe_2015-2025/Documents/nanosafety_2015-2025.pdf.
- (4) Behra, R.; Krug, H. Nanoecotoxicology: nanoparticles at large. *Nature Nanotechnology* **2008**, 3: 253-254.
- (5) Baun, A.; Hartmann, N.B.; Grieger, K.; Kus, K.O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology* **2008**, 17: 387-395.
- (6) Long Z, Ji J, Yang K, Lin D, Wu F: Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes' toxicity toward algae. *Environmental Science and Technology* **2012**, 46: 8458-8466.
- (7) Pereira, M.M.; Mounton, L.; Yéprémian, C.; Couté, A.; Lo, J.; Marconcini, J.M.; Ladeira, L.O.; Raposo, N.R.; Brandão, H.M.; Brayner, R. Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cellulose nanofibers in *Chlorella vulgaris*. *J Nanobiotechnology* **2014**, 12: 15.
- (8) Nylander, W. Les lichens du Jardin du Luxembourg. *Bulletin Societe Botanique de France* **1866**, 13: 364-372.
- (9) Conti, M.E.; Cecchetti, G. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review. *Environmental Pollution* **2001**, 114: 471-492.
- (10) Nimis, P.L.; Scheidegger, C.; Wolseley, P.A. *Monitoring with lichens: monitoring lichens*. Kluwer Academic Published in Association with the NATO Scientific Affairs Division, 2002.

- (11) Fuga, A.; Saiki, M.; Marcelli, M.P.; Saldiva, P.H.N. Atmospheric pollutants monitoring by analysis of epiphytic lichens. *Environmental Pollution* **2007**, 151: 334 340.
- (12) Kaffer, M.I.; Lemos, A.T.; Apel, M.A.; Rocha, J.V.; Martins, S.M.A.; Vargas, V.M.F. Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. *Environmental Pollution* **2012**, 163: 24 31.
- (13) *Ambient air. Biomonitoring with lichens. Assessing epiphytic lichen diversity*. British Standard Institution: London, 2014.
- (14) Datsyuk, V.; Kalyva, M.; Papagelis, K.; Parthenios, J.; Tasis, D.; Siokou, A. et al. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon* **2008**, 46: 833 840.
- (15) Le Blanc, F.S.C. Possibilities and methods for mapping air pollution on the basis of lichen sensitivity. *Mitt. Forstl. Bund Vers Anst* **1971**, 92: 103 126.
- (16) Zetsche, E.M.; Meysman, F.J.R. Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *Journal of Plankton Research* **2012**, 34: 493 509.
- (17) Munzi, S.; Pisani, T.; Loppi S. The integrity of lichen cell membrane as a suitable parameter for monitoring biological effects of acute nitrogen pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2009**, 72: 2009 2012.
- (18) Brown, D.H.; Brown, R.M. Mineral cycling and lichens: the physiological basis. *Lichenologist* **1991**, 23: 293 307.
- (19) Figueira, R.; Souza, A.J.; Brown, D.H.; Catarino, F.; Pacheco, A.M.G. Natural levels of saline elements in lichens: determination of cellular fractions and their importance as saline tracers. *Lichenologist* **1999**, 31: 183-196.
- (20) Jorio, A.; Saito, R.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M.S. Determination of nanotubes properties by Raman spectroscopy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond* **2004**, 362: 2311 2336.
- (21) Khodakovskaya, M.V.; de Silva, K.; Biris, A.S.; Dervishi, E.; Villagarcia, H. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano* **2012**, 27: 2128 2735.
- (22) Wei, L.P.; Thakkar, M.; Chen, Y.H.; Ntim, S.A.; Mitra, S.; Zhang, X.Y. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Aquat Toxicol* **2010**, 100: 194 201.
- (23) Schwab, F.; Bucheli, T.D.; Camenzuli, L.; Magrez, A.; Knauer, K.; Sigg, L.; Nowack, B. Diuron sorbed to carbon nanotubes exhibits enhanced toxicity to *Chlorella vulgaris*. *Environ Sci Technol* **2013**, 47: 7012 7019.
- (24) Nieboer, E.; Richardson, D.H.S. Lichens as monitors of atmospheric deposition. In: *Atmospheric pollutants in natural waters*. Edited by Eisenreich S.J. Ann Arbor Science, 1981, pp 339 388.
- (25) Nash III, T.H. *Lichen Biology*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 2008.
- (26) Paoli, L.; Guttová, A.; Grassi, A.; Lackovičová, A.; Senko, D.; Loppi, S. Biological effects of airborne pollutants released during cement production assessed with lichens (SW Slovakia). *Ecological Indicators* **2014**, 40: 127 135.
- (27) Viana, C.O.; Menezes, M.A.B.C.; Pereira, E.C.M. Epiphytic lichens on air biomonitoring in Belo Horizonte City, Brazil: a preliminary assessment. *International Journal of Environment and Health* **2011**, 5: 324 337.
- (28) Oliveira, L.F.C.; Pinto, P.C.C.; Marcelli, M.P.; Santos, H.F.; Edwards, H.G.M. The analytical characterization of a depside in a living species spectroscopic and theoretical analysis of lecanoric acid extracted from *Parmotrema tinctorum* Del. Ex Nyl. lichen. *Journal of Molecular Structure* **2009**, 920: 128 133.

- (29) Ohmura, Y.; Kawachi, M.; Kasai, F.; Sugiura, H.; Ohtara, K.; Kon, Y.; Hamada, N. Morphology and chemistry of *Parmotrema tinctorum* (Parmeliaceae, Lichenized Ascomycota) transplanted into sites with different air pollution levels. *Bull Natl Mus Nat Sci* **2009**, 35: 91 98.
- (30) Tretiach, M.; Adamo, P.; Bargagli, R.; Baruffo, L.; Carletti, L.; Crisafulli, P.; Giordano, S.; Modenesi, P.; Orlando, S.; Pittao, E. Lichen and moss bags as monitoring devices in urban areas. Part I: influence of exposure on sample vitality. *Environ Pollut* **2007**, 146: 380 391.
- (31) Honegger, R. Water relation in lichens visualized with cryo-techniques: an ultrastructural approach. *Giornale Botanico Italiano* **1995**, 129: 149 157.
- (32) Tretiach, M.; Pavanetto, S.; Sanità di Toppi, L.; Piccotto, M. Water availability modifies tolerance to photo-oxidative pollutants in transplants of the lichen *Flavoparmelia caperata*. *Oecologia* **2012**, 168: 589 599.
- (33) Beckett, R.P. Some aspects on the water relations of the lichen *Parmotrema tinctorum* measured using thermocoupled psychrometry. *The Lichenologist* **1996**, 28: 257 266.
- (34) Jensen, M.; Krickler, R. Chlorophyll fluorescence measurements in the field: assessment of the vitality of large numbers of lichen thalli. In: *Monitoring with lichens: monitoring lichens*. Edited by Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA. Kluwer Academic Published in Association with the NATO Scientific Affairs Division 2002, pp 327 332.
- (35) Piccotto, M.; Tretiach, M. Photosynthesis in chlorolichens: the influence of the habitat light regime. *J Plant Res* **2010**, 123: 763 775.
- (36) Bertuzzi, S.; Tretiach, M. Hydrogen sulphide inhibits PSII of lichen photobionts. *The Lichenologist* **2013**, 45: 101 113.
- (37) Schwab, F.; Bucheli, T.D.; Lukhele, L.; Magrez, A.; Nowack, B.; Sigg, L.; Knauer, K. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environ Sci Technol* **2011**, 45: 6136 6144.

RESPOSTA DO EDITOR

----- Forwarded message -----

From: **EES (ELS)** <ees2@elsevier.com>

Date: 2015-02-19 11:30 GMT-03:00

Subject: EES-15-124: Interim Decision

To: camilaoviana@gmail.com, kmilinha_ov@hotmail.com

Ms. No.: EES-15-124

Title: Physiological changes of the lichen *Parmotrema tinctorum* as result of carbon nanotubes exposition

Corresponding Author: Dr. C.O. VIANA

Authors: Raissa Vaz; Abraham Cano; Adelina Santos; Luiz Cançado; Luiz Ladeira; Ary Junior

Dear Dr. VIANA,

Thank you for submitting your manuscript to Ecotoxicology and Environmental Safety. The reviewers have made suggestions which the Editor feels would improve your manuscript. The Editor encourages you to consider these comments and make an appropriate revision of your manuscript. The reviewers' comments are below.

Please submit your revision online within 60 days by logging onto the Elsevier Editorial System for Ecotoxicology and Environmental Safety:

<http://ees.elsevier.com/ees/>

Your username is: camilaoviana@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/ees/automail_query.asp

The manuscript record can be found in the "Submissions Needing Revision" menu.

When submitting your revised paper, please include a separate document uploaded as "Response to Reviews" that carefully addresses the issues raised in the below comments, point by point. You should also include a suitable rebuttal to any specific request for change that has not been made.

...

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript.

With kind regards,

Paul K Sibley, PhD

Associate Editor

Ecotoxicology and Environmental Safety

Email: ees2@elsevier.com

Reviewers' comments:

Dear Ms/Mr Viana;

Based on the two reviews provided below, I have determined that your manuscript may be acceptable for publication pending major revisions. The primary concerns have been raised by reviewer #2 and consist of both technical and editorial comments. On the latter point, please have someone whose first language is English review the manuscript before re-submission. Manuscripts not meeting the standard for the journal will be returned.

Please address each of the reviewer's comments in a summary letter in which you state the page and line number of the change that was made in response to the comment and show where the change has been made in the manuscript using highlighting or bolding. When responding to the reviewers comments, please make sure that the responses are reflected in the corresponding changes in the text. Some of the reviewer's comments seek explanation. You should provide this in both the summary letter and in the manuscript (the explanation(s) sought by the reviewers likely arose from insufficient information and/or

clarity in the manuscript which indicates that it should be added to the revised paper).

Sincerely,
Paul Sibley
Associate Editor, EES

Reviewer #1: I go through the manuscript and found its suitability for the publication in EES.

The paper entitled "Physiological changes of the lichen.....exposure" deals with the effect of CNT on the lichen *Parmotrema tinctorum* and found its suitability for future monitoring.

Some of the references cited in the text not in journal style.

incorporate some current work related with physiology and lichens.

The quality of Figure 1 need improve.

English grammar need improvement.

Overall paper may be accepted.

Reviewer #2: the English language requires extensive improvement

title: "Physiological changes in the lichen *Parmotrema tinctorum* as result of carbon nanotubes exposure"

abstract: too long and not fully informative

keywords: avoid those already in title

please express the aim in the form of a testable hypothesis

photobiont cells are not located in the upper lichen cortex, that is made up just of mycobiont cells, but immediately below

better photobiont cell viability

I suggest the authors add refs to common CNT air concentrations to understand how realistic were their treatments

a QA of metal analysis should be added

was data normality checked?

figure 2A has non-English captions

I do not understand the phrase at ls. 214-216

if changes in intracellular contents are explained in terms of altered cell membrane permeability

(reasonable), how are changes in wall bound contents explained? usually the latter represent recent changes in ambient inputs

if photobiont cells were impaired, why photosynthetic efficiency was not affected? please discuss