

**MONITORAMENTO DA EMISSÃO DE POLUENTES POR MOTORES MOVIDOS
A BIODIESEL ATRAVÉS DO USO DE LÍQUEN**

IWELTON MADSON CELESTINO PEREIRA

**MONITORAMENTO DA EMISSÃO DE POLUENTES POR MOTORES MOVIDOS
A BIODIESEL ATRAVÉS DO USO DE LÍQUEN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geografia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Geografia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira
Coorientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Morais de Oliveira

RECIFE
2014

Catálogo na fonte
Bibliotecário Tony Bernardino de Macedo, CRB4-1567

P436m Pereira, Iwelton Madson Celestino.
Monitoramento da emissão de poluentes por motores movidos a biodiesel através do uso de líquen / Iwelton Madson Celestino Pereira. – Recife: O autor, 2014.
64 f. il. ; 30cm.

Orientador: Prof^a. Dr^a. . Eugênia Cristina Gonçalves Pereira.
Coorientador: Prof. Dr. Antônio Fernando Morais de Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CFCH. Programa de Pós-graduação em Geografia, 2014.
Inclui referências.

1. Geografia. 2. Biodiesel. 3. Biomonitoramento. 4. Líquen. 5. Poluentes I. Pereira, Eugênia Cristina Gonçalves (Orientadora). II. Oliveira, Antônio Fernando Morais de (Coorientador). III. Título.

910 CDD (22.ed.)

UFPE (BCFCH2014-47)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOGRAFIA
CURSO DE MESTRADO**

**MONITORAMENTO DA EMISSÃO DE POLUENTES POR MOTORES MOVIDOS
A BIODIESEL ATRAVÉS DO USO DE LÍQUEN**

Dissertação defendida e **Aprovada** pela banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira
1º Examinador/Presidente

Prof. Dr. Fernando de Oliveira Mota Filho
2º Examinador

Prof^ª. Dr^ª. Mônica Cristina Barroso Martins
3º Examinador

Recife, 27 de fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

O agradecimento é uma forma sincera de demonstrar a importância que algumas ações tiveram em determinado momento. Dizer obrigado é na verdade dizer que o falante se sente obrigado (imperativamente) a devolver o favor a ele prestado. Mas como se obrigar a devolver o amor, o afeto, o carinho, a atenção e o cuidado recebidos? Devolvendo na mesma intensidade esses sentimentos? Mas como seria possível calcular a intensidade de sentimentos tão particulares, que só podem ser demonstrados nas sutilezas dos pequenos atos?

Sobre esta problemática, só posso me refugiar em minha zona de conforto para resolver questões de tão grande magnitude. Como um acadêmico, aprendi a recorrer às palavras para expressar o conjunto de sensações e pensamentos que em mim se formam.

Em determinado momento da minha vida afirmei que as palavras não são por nós formadas, pois somos apenas meio para que elas cheguem ao mundo. Ainda sobre o falar disse que este ato seria a real insubmissão das palavras, e, sendo esta uma verdade, faço uso de minhas insubmissas palavras para expressar a avalanche de sensações que me tomam ao escrever estes verdadeiros agradecimentos.

Agradecer a Deus pode parecer clichê, mas, para mim, expressa o real sentimento de gratidão pela força, coragem e determinação que tenho tido durante toda a minha vida acadêmica. A paixão com que tenho vivido a minha experiência de vida só pode ser explicada por mim – talvez por meu limitado intelecto – como sendo divina.

Agradeço àqueles que, mesmo tendo pouco (financeiramente falando), me ofereceram um mundo de exemplos de dignidade, caráter, coragem e força. Incentivaram cada etapa de minha vida e comemoraram comigo cada realização e conquista. Obrigado a meus pais Egildo Pereira e Irene Pereira, pelo amor ofertado.

Agradeço àquele que só posso descrever, parafraseando-o, como companheiro e todos os significados que essa palavra pode carregar. Agradeço pela dedicação e pelo apoio em todo esse processo, pela correção, em primeira instância, de todo o texto e pela discussão acerca da apresentação dos resultados. Agradeço por colocar um pouco de ordem nessa minha vida, que mais parece caótica. Obrigado por querer estar ao meu lado, Pedro Paulo Lira.

Agradeço ao grupo de pessoas que mesmo indiretamente influenciaram na constituição de quem eu sou, e sempre repercutirão em quem eu serei. Obrigado, meu irmão Egildo Junior, minha irmã (que a vida me deu) Maria de Fátima, minha segunda mãe Marilene Talvanes, minha tia Maria Cristina (que nunca se mostrou duvidosa sobre essa e tantas outras conquistas minhas), minha tia Lúcia (que sempre abriu as portas de sua casa, sem questionamentos ou

ressalvas), minha avó Lourdes Celestino (pelo exemplo diário de vigor e força), meus sobrinhos Nicolas e Gustavo (meus pequenos amores, que, com sua simplicidade e alegria, têm me ensinado sobre a grata felicidade de ser tio) e meus, muitos, tios, tias, primos e primas (e agregados), que me ensinaram como a estrutura familiar é importante na construção do indivíduo.

Agradeço de forma especial àquela que me abriu os caminhos da ciência, demonstrando carinho e zelo durante o processo de orientar. Obrigado, Eugênia Pereira, pela paciência e dedicação.

Agradeço àquele que aceitou contribuir, fornecendo o suporte necessário para o bom desenvolvimento do trabalho. Obrigado pela coorientação, Antonio Fernando Oliveira.

Agradeço àqueles que se dispuseram a contribuir de forma imensurável, compondo a banca de avaliação desta dissertação. Obrigado, Fernando Mota Filho, Mônica Martins, Emerson Peter Falcão e Ranyére Nóbrega.

Agradeço aos diversos amigos que essa faculdade me trouxe, pessoas que de forma excepcional conseguiram se fazer importantes na minha vida, e a todas aquelas que as acompanharam, “porque a verdadeira rede de contatos é a que se faz no plano físico” (Biscoito Treloso, 2014, adaptado). Obrigado, Michel Lacerda, Ricardo Lima, Leonice Cavalcante, Dannilo Lima, Alice Medeiros, Talitha Vasconcelos, Jailton Marques e tantos outros que felizmente não caberiam em dezenas de páginas.

Agradeço ao irmão que a Universidade Federal de Pernambuco me deu, por todo o sincero afeto a mim dispensado. Obrigado, Wellington Martinho, pelo companheirismo e atenção. Especialmente obrigado pela grata surpresa de apadrinhar o pequeno Davi que nem chegou e já provoca profundos sentimentos neste padrinho de primeira viagem.

Agradeço àqueles que desde a graduação construíram uma amizade forte e duradoura, que espero poder desfrutar durante toda uma vida. Obrigado, Andrezza Karla (parceira a quem dedico um afeto todo especial), Débora Meira, Maria Melo, Sidney Santana, Renata Nemésio, Leidiane Valeska, Ítalo França, Ana Katarina e, em especial, Igor de Almeida, que, mesmo tendo acabado de defender sua monografia, se dispôs a me ajudar na construção do abstract deste trabalho.

Agradeço a alguém que chegou de forma indireta na minha vida e hoje ocupa um lugar todo especial. Agradeço pela acolhida e por estar trazendo mais alguém pra alegrar meus dias. Obrigado a você, Patrícia Bazante, e ao Davi, que só pela expectativa da chegada já consegue produzir felicidade.

Agradeço a duas pessoas muito especiais que, nestes momentos finais, abdicaram de seus próprios trabalhos acadêmicos para me ajudar em minhas análises químicas. Impossível dizer o quanto eu agradeço. Obrigado, Lourdes Buriel e Hérica Barbosa.

Agradeço aos integrantes do Núcleo de Estudos Ambientais e do Laboratório de Geografia Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco, aqui representados por aqueles que me ajudaram de forma contundente na realização de minhas extrações químicas. Obrigado, Deyvison Natanael, Flávia Callado, Ana Cláudia, Kécia Santana, Lucas André e Tâmara Letícia.

Agradeço pela estrutura laboratorial oferecida e a disposição de estar de braços abertos para receber novos estudantes, mesmo na ausência da obrigatoriedade. Obrigado, professor Nicácio Henrique.

Agradeço às minhas psicólogas queridas, que tão carinhosamente têm me acolhido no exercício de minha “psicologia técnica”. Obrigado, Karine Porpino, Juliana Lucena, Isabel Pedrosa, Melina Pereira e Mayara Lacerda.

Agradeço àqueles que, mais do que sua casa, abriram suas vidas pra me receber por um período importante da minha vida. Obrigado, Juliana Mazza e Márcio Barra Valente.

Agradeço aos amigos que, mesmo fisicamente distante, se mostram presentes. Obrigado, Danilo Carvalho, Ademir Vilaronga (Júnior) e Marcelo Cavalcanti.

Agradeço àquele que abraçou este projeto sem ressalvas e acreditou que seria possível e viável toda logística proposta. Também agradeço à instituição que abriu suas portas, abraçando as ideias e as metodologias sugeridas. Obrigado, James Melo e Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Agradeço ao órgão que dispensou a minha bolsa, e com isso viabilizou a construção do presente estudo. Obrigado ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Obrigado à vida por ter me colocado em contato com tantas pessoas e instituições maravilhosas.

“Não sou poeta, mas uma estrela é uma estrela,
ninguém pode negar.”
José Saramago (2004)¹

¹ SARAMAGO, J. **Ensaio sobre a Lucidez**. São Paulo, Companhia das Letras, 2005, 325p.

RESUMO

Cabe ao geógrafo buscar entender os elementos do ecossistema e sua complexa relação com o meio. A humanidade, em seu processo adaptativo, desenvolveu mecanismos que acabaram interferindo diretamente na qualidade de vida de diversos organismos vivos. Com capacidade física relativamente moderada e estrutura corpórea mediana, para os padrões do planeta, o *Homo sapiens sapiens* teve que criar meios de locomoção rápida e eficiente. Após um longo processo de desenvolvimento tecnológico, o surgimento dos automóveis pareceu resolver, de forma satisfatória, o problema de locomoção. Porém, a fonte de energia desses meios de transporte se converteu num novo problema, uma vez que sua distribuição geográfica é limitada. Hoje, a esta questão de ordem logística e econômica adicionam-se questões referentes à qualidade do ar. Buscando diminuir a dependência econômica desses combustíveis e, como consequência, diminuir os impactos gerados por seu consumo excessivo, novos combustíveis foram desenvolvidos com a designação de renováveis. O mais recente expoente desse grupo é o biodiesel. Incrementos desse combustível em diesel de petróleo (petrodiesel) têm tentado diminuir a emissão de poluentes. Uma forma de mensurar e quantificar a quantidade de poluentes na atmosfera é o uso de elementos da biota como monitores das variações ambientais. Tal monitoramento se faz por meio da observação do comportamento e da fisiologia dos indivíduos estudados. Esse processo é conhecido como biomonitoramento. Dentre as diversas espécies que podem ser utilizadas para monitorar a presença de poluentes atmosféricos, está a *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., espécie endêmica do Brasil e muito comum no Nordeste brasileiro. No presente estudo, objetivou-se avaliar a resposta biológica do líquen *C. verticillaris* a poluentes emanados por motor estacionário movido a biodiesel B5 (5% de biodiesel diluído em 95% de petrodiesel), em condições laboratoriais: analisando os teores de pigmentos fotossintéticos da espécie e como estes se comportam após exposição aos poluentes; analisando a produção de fenóis pela espécie, durante o período pós-exposição; avaliando a vitalidade celular após o experimento; e determinando se em períodos curtos de exposição o líquen já demonstra respostas negativas e danos consideráveis em sua estrutura. Para tal, se dividiu o material liquênico, coletado em áreas saudáveis, em três grupos: Experimental 1, Experimental 2 e Experimental 3. Decorridos 30 e 60 dias, as amostras foram submetidas à análise de clorofila e feofitina; produção fenólica; e avaliação da vitalidade celular: Vermelho Neutro e Azul de Evans. O grupo Experimental 3 só foi analisado após 30 dias. Ao final do estudo se percebeu que durante exposições por tempo igual ou superior a 15 minutos, o líquen varia metabolicamente, em função da distância da fonte poluidora; a produção de pigmentos foi afetada de forma significativa nas amostras expostas por 15 minutos; os tempos de 15 e 30 minutos do grupo Experimental 3 obtiveram uma taxa de vitalidade celular, bem baixa; a maior interferência na produção de fenóis ocorreu após 60 minutos de exposição, no grupo Experimental 3; e, embora o grupo Experimental 1 não tenha mostrado uma diminuição drástica na produção de seus pigmentos e fenóis, é possível indicar um decréscimo médio, quando comparado ao controle. Assim, é possível afirmar que a adição de 5% de biodiesel em petrodiesel mostrou-se incipiente, revelando, talvez, a necessidade de majoração desse percentual, para minimizar a emissão de compostos nocivos como o SO₂ e eventuais danos a estruturas vivas.

Palavras-chave: Biodiesel. Biomonitoramento. Líquen. Poluentes.

ABSTRACT

It is up to the geographer to seek to understand the elements of the ecosystem and its complex relation with the environment. Humanity, in its adaptive process, developed mechanisms that interfered directly in the quality of life of several living organisms. With relatively moderate physical capacity and median body structure, for the patterns of the planet, the *Homo sapiens sapiens* had to create fast and efficient means of transportation. After a long process of technological development, the emergence of automobiles seemed to solve, satisfactorily, the problem of locomotion. But the source of energy of these means of transportation has become a new problem, since their geographical distribution is limited. Today to this logistic and economic question are added issues related to air quality. Seeking to decrease economic dependence on these fuels and, consequently, reduce the impacts generated by its excessive consumption, new fuels were developed and named renewable. The most recent exponent of this group is the biodiesel. Increments of this fuel in petroleum diesel (petrodiesel) have attempted to reduce the emission of pollutants. One way to measure and quantify the amount of pollutants in the atmosphere is the use of biota elements as monitors of environmental variations. Such monitoring is done through observation of the behavior and physiology of the studied individuals. This process is known as biomonitoring. Among the different species that can be used to monitor the presence of air pollutants is *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., endemic species from Brazil and very common in Northeast Brazil. The present study aimed to evaluate the biological response of the lichen *C. verticillaris* to pollutants emanating from stationary engines running on biodiesel B5 (5 % biodiesel diluted in 95% petrodiesel), on laboratory conditions: analyzing the content of photosynthetic pigments of the species and how they behave after exposure to pollutants; analyzing phenolic production by the species, during the post-exposure period; evaluating the cellular vitality after the experiment; and determining if on short periods of exposure the lichen already shows negative responses and considerable damage on its structure. To this, the lichen material was divided, collected in healthy areas, in three groups: Pilot 3min, Pilot 30min and Experimental 3. After 30 and 60 days, the samples went under chlorophyll and phaeophytin analyses; phenolic production; and evaluation of cellular vitality: Neutral Red and Evans' Blue. The Experimental 3 group was only analyzed after 30 days. At the end of the study it was noticed that during long exposures by equal or more than 15 minutes, the lichen varies metabolically, depending on the distance from the pollution source; the pigment production was significantly affected in samples exposed for 15 minutes; the times of 15 and 30 minutes, of the Experimental 3 group, achieved a rate of cell vitality, very low; the biggest interference in the production of phenolic occurred after 60 minutes of exposure, in the Experimental 3 group; and although the Pilot 3min group hasn't shown a drastic decrease in production of its pigments and phenolic, it is possible to indicate a medium decrease when compared to the control. Thus, it is possible to say that the addition of 5 % biodiesel in petrodiesel proved to be incipient, revealing, perhaps, the need to increase this percentage to minimize the emission of harmful compounds such as SO₂ and possible damage to living structures.

Keywords: Biodiesel. Biomonitoring. Lichen. Pollutants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr. em campo.....	29
Figura 2 – Local de realização da coleta de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr. no município de Alhandra-PB	29
Figura 3 – Motor estacionário acoplado a grupo gerador. Utilizado na queima do biodiesel B5, durante o experimento	30
Figura 4 – Saída do escapamento do motor estacionário e líquen durante a exposição aos gases da queima do biodiesel B5	32
Figura 5 – Saída do escapamento do motor estacionário e líquen durante a exposição aos gases da queima do biodiesel B5	32
Figura 6 – Esquema da disposição das amostras de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr. durante a exposição a biodiesel B5, e da influencia dos ventos na dispersão de poluentes.....	33
Figura 7 – Balões de erlenmeyer e tubos de vidro durante extração dos fenóis liquênicos de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr.....	35
Figura 8 – Células submetidas a vermelho neutro.....	37
Figura 9 – Talo de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr., controle laboratorial (não exposta ao biodiesel B5), quase sem danos estruturais revelados pelo de azul de Evans	38
Figura 10 – Talo de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr., exposta ao biodiesel B5, com danos estruturais revelados pelo de azul de Evans	38
Figura 11 – Esquema da molécula de clorofila (a) sendo degradada em feofitina (a) ..	41
Figura 12 – Gráfico dos teores de clorofila e feofitinas, após 30 dias, de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr., controle e exposto por 3 minutos à fumaça da queima de biodiesel B5, em três distâncias.....	42
Figura 13 – Gráfico dos teores de clorofila e feofitinas, após 60 dias, de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr., controle e exposto por 3 minutos à fumaça da queima de biodiesel B5, em três distâncias.....	42
Figura 14 – Gráfico dos teores de clorofila e feofitinas, após 30 dias, de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr., controle e exposto à fumaça da queima de biodiesel B5	44
Figura 15 – Modelo estrutural das principais substâncias liquênicas ocorrentes em <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr.....	46
Figura 16 – Gráfico dos teores de FUM, PRO e ATR de <i>Cladonia verticillaris</i>	

(Raddi) Fr., exposta à fumaça da queima de biodiesel B5 durante 3 minutos	48
Figura 17 – Gráfico dos teores de fenóis produzidos por <i>Cladonia verticillaris</i>	
(Raddi) Fr., exposta à fumaça da queima de biodiesel B5 durante 30 minutos	49
Figura 18 – Gráfico dos teores de fenóis produzidos por <i>Cladonia verticillaris</i>	
(Raddi) Fr., exposta à fumaça da queima de biodiesel B5 durante 15, 30 e 60 minutos.	51
Figura 19 – Gráfico do percentual de células vivas e mortas de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr., determinadas pela absorção do corante Vermelho Neutro...	53
Figura 20 – Imagens do talo de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr., exposta a gases emanados pela queima de motor movido a biodiesel B5	55
Figura 21 – Gráfico da absorbância de Azul de Evans presente em talos de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr., submetida a biodiesel B5	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	TEXTOS E CONTEXTOS DE UMA BIOGEOGRAFIA DAS SOCIEDADES HUMANAS	15
2.1	Geografia: a ciência das relações ...ou... O homem no meio	15
2.2	Problemas ambientais e respostas biológicas ...ou... Olhando os líquens e pensando os homens	19
2.3	<i>Cladonia verticillaris</i> ...ou... Um biomonitor notoriamente conhecido	23
2.4	Diesel ...ou... Uma energia potencialmente agressiva	25
2.5	Biocombustíveis ...ou... A esperança de um mundo renovável	26
3	OBJETIVOS	29
3.1	Geral	29
3.2	Específicos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Coleta e armazenamento do material líquênico	30
4.2	Montagem dos experimentos	31
4.3	Processamento e análise das amostras	34
4.3.1	Análise de clorofila e feofitina	34
4.3.2	Análise de fenóis	36
4.3.3	Avaliação da vitalidade celular	37
4.3.3.1	Vermelho Neutro	37
4.3.3.2	Azul de Evans	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Clorofila e feofitina em <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr.	40
5.2	Fenóis	47
5.3	Danos estruturais e vitalidade celular	53
5.3.1	Vermelho Neutro	53
5.3.2	Azul de Evans	55
5.4	Análise integrada	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O planeta Terra, desde sua origem, vem sofrendo enormes alterações físico-químicas em sua estrutura. Por este motivo, os gases componentes da atmosfera estiveram em processo de constante mudança. As alterações ocorreram de forma natural e, mesmo assim, sempre causaram forte impacto nos ecossistemas. Ross (2009, p. 190) lembra que “milhares de espécies já nasceram e morreram nesses 3 bilhões de anos da história da vida no planeta Terra”, e que cada uma delas, em ciclos temporais distintos, traçaram/traçam relações de dependência com o seu meio, adaptando-se e adaptando seu hábitat da melhor forma possível.

Esse processo de adaptação, bem como a relação espécie-meio, foi primeiramente descritos por Charles Darwin há 175 anos (RICKLEFS, 2010), que, ao observar diversas espécies das ilhas Galápagos, notou que alguns indivíduos possuíam características distintas mesmo tendo nitidamente provindo de ancestrais comuns. Para Darwin, estas diferenciações só poderiam ser explicadas por modificações independentes dos descendentes dos colonizadores originais, como forma de adaptação às condições físicas das diferentes ilhas componentes do arquipélago. Mais tarde, tal constatação foi o motivo para o desenvolvimento da Teoria da Evolução pela Seleção Natural, que se sustenta na premissa de que os fatores naturais presentes em determinada localidade funcionam como um seletor natural de indivíduos e espécies.

Hoje, observar espécies para, a partir de suas respostas fisiológicas, perceber alterações no meio em que estão inseridas tornou-se prática corriqueira no âmbito científico-acadêmico. Nomeadas de biomonitoramento e/ou bioindicação, estas práticas/técnicas converteram-se numa forma menos onerosa de monitorar mudanças no habitat, tendo em vista que monitores mecânicos demandam alto investimento financeiro, com resultado qualitativo equivalente. Essa observação contemporânea somente é possível em virtude das reflexões de Darwin no que diz respeito à adaptabilidade de organismos vivos e suas respostas a mudanças no ecossistema.

Não diferentemente das outras espécies, o homem² surgiu de forma a interagir com o meio e traçar relações próprias com este. Ao longo do tempo passou a interferir tão intensamente neste ambiente de suas ações que analisar o ambiente desconsiderando as ações humanas chega a ser irresponsável e/ou condescendente demais.

² Onde se lê **homem**, durante todo o texto, deve-se entender **ser humano** (homem e mulher). Apenas optou-se por usar o termo homem como gênero não marcado buscando melhorar a estética da narrativa textual.

Na busca por praticidade e comodidade, o ser humano criou meios e mecanismos, a partir de aparatos técnicos, que facilitam sobremaneira sua vida, adaptando o ambiente a si sem que o inverso acontecesse plenamente. A tentativa de sanar um déficit locomotivo, inerente ao *Homo sapiens sapiens*, impulsionou o homem na busca por maneiras de locomoção no espaço, comprimindo o tempo. Dentre as resoluções primárias para este problema surgiu o automóvel, meio de transporte rápido, que se difundiu de forma espetacular ao redor do mundo. Contudo, percebeu-se, após anos, que seu uso em larga escala trouxe um ônus grande demais para o planeta. Movidos predominantemente por derivados de petróleo, bem mineral finito, os veículos, após se multiplicarem e ocuparem as ruas das grandes metrópoles tornaram-se uma das maiores fontes poluidoras das áreas urbanas.

Uma vez constatado que a queima de combustíveis fósseis libera gases nocivos à saúde humana, dentre eles o CO₂ (dióxido de carbono) – composto químico que em grande quantidade na atmosfera causa o agravamento do efeito estufa e problemas respiratórios – e o SO₂ (dióxido de enxofre), iniciou-se a busca por combustíveis alternativos, menos impactantes ao meio natural e à qualidade de vida na Terra. Durante essa busca, percebeu-se a possibilidade de sintetizar combustíveis a partir de espécies vegetais, possibilitando a obtenção de matéria prima renovável com baixo impacto ambiental.

Os chamados biocombustíveis surgiram, primeiramente, como alternativa às grandes crises do petróleo experimentadas no início do século XX. Passadas essas crises e com o crescente entendimento mundial de que os combustíveis fósseis são finitos, eles assumiram o posto de combustíveis renováveis. Entretanto, as constantes descobertas de novas jazidas de petróleo e gás e o recorrente prolongamento da expectativa de vida útil das reservas mundiais acabaram por deixar esses combustíveis em segundo plano. Hodiernamente, porém, com a constante discussão acerca da necessidade de preservação da qualidade de vida e da salubridade ambiental, esses combustíveis ganham destaque como fonte menos poluidora do ambiente, dando a possibilidade de conquista do conforto necessário/procurado com um menor impacto.

Um grande expoente desses combustíveis renováveis é o biodiesel. Capaz de substituir o diesel de petróleo de forma satisfatória, esse combustível promete emissão de SO₂ na casa dos 2%, e emissão de particulados bem baixos. Contudo, o uso de 100% desse combustível no motor exige modificações, tornando inviável a troca da frota nacional. Visando resolver esse problema o governo brasileiro decidiu obrigar a mistura de biodiesel no diesel de petróleo. Os motores em uso hoje conseguem rodar sem déficit de qualidade nem danos à estrutura, com

20% de biodiesel diluído em petrodiesel. De todo modo, hoje a legislação brasileira só obriga a adição de 5%.

Entretanto, a produção destes “biocombustíveis”, ou combustíveis “renováveis”, ou “agrocombustíveis”, deixa lacunas para uma série de questões: quão limpos são? O benefício, em comparação aos combustíveis comuns, é apenas a sua renovabilidade? Quando misturados a combustíveis comuns (derivados de petróleo), reduzem a nocividade destes? A proporção hoje usada na mistura biocombustível/petrocombustível é suficiente para denominá-la sustentável? É possível indicar estes combustíveis de origem biológica como resposta aos problemas dos poluentes automotivos? Como organismos vivos reagem aos gases emanados pela queima de algum destes biocombustíveis?

Perante tantas questões a serem respondidas, a lacuna científica deixada pela ausência de estudos que se proponham a investigar a resposta biológica dada por organismos vivos expostos ao produto da queima do biodiesel e suas diluições em petrodiesel é inadmissível.

É verdade que seria inviável, nesta pesquisa, responder à metade das questões recém levantadas, porém, no intuito de responder a algumas delas, e, entendendo que é pertinente ao geógrafo o papel de estudar o meio de modo dinâmico e sistêmico, intentou-se aqui perceber, a resposta biológica dada, pelo líquen, a ação de poluentes atmosféricos emanados pela queima do biodiesel (biocombustível) diluído em diesel comum à 5%.

Assim sendo, buscando propiciar ao leitor o entendimento dos caminhos percorridos para as reflexões propostas neste trabalho, apresentar-se-ão a seguir uma revisão da literatura – produto alcançado a partir da costura de recortes de corpos teóricos e empíricos que compuseram a lente com que foram analisados os dados de pesquisa –, os objetivos (geral e específicos), os materiais e os métodos usados durante a investigação, seguidos pela apresentação dos resultados e suas respectivas discussões. Concluiu-se então com a construção de algumas considerações finais.

2 TEXTOS E CONTEXTOS DE UMA BIOGEOGRAFIA DAS SOCIEDADES HUMANAS

2.1 Geografia: a ciência das relações ...ou... O homem no meio

A observação e a busca da compreensão da “primeira natureza”³ são foco de estudo da humanidade há muito tempo. Esse fato pode ser justificado pela necessidade que o humano tem de controlar o espaço e deste se apropriar. Quando o *Homo sapiens sapiens* dominou as técnicas de plantio e cultivo de gêneros vegetais, bem como a criação de espécies animais, acabou desencadeando um processo de modificação do “espaço natural”, que pode até ser considerado sem volta (COX; MOORE, 2009; ROSS, 2009). Este processo nem sempre pode ser visto como malévolo, devendo apenas ser entendido como parte da adaptação do meio às necessidades humanas.

O processo adaptativo que impele uma dada espécie a modificar o meio para melhor se organizar e/ou se proteger de intempéries não é exclusivamente humano. Formigas causam modificações descomuns na estrutura física das áreas de atuação dos formigueiros. Seus túneis e câmaras internas demonstram como uma sociedade pode modificar o meio para garantir sua sobrevivência. Cupins são, também, ótimos exemplos de espécie modificadora de seu hábitat. Organizações estruturais complexas são típicas de espécies frágeis que vivem em sociedade, como os cupins (BICUDO, 2010). A diferença marcante entre o ser humano e os exemplos aqui apresentados é a escala de atuação: enquanto formigas e cupins atuam em escala local (CZEPAK, 2003), interferindo apenas no microambiente, a humanidade tem influência sobre todo o globo terrestre.

O geógrafo, neste contexto, tem se dedicado especialmente ao estudo do espaço, bem como das complexas relações humanas nele experimentadas. É verdade que nem sempre foi objeto da Geografia o estudo das relações do homem no/com o meio, contudo, desde o naturalismo, a observação do ambiente já movia os primeiros geógrafos. E é a partir desta necessidade de entender o espaço fundamental de sobrevivência do homem que a Geografia Moderna tem se consolidado e direcionado a descrição e o estudo das relações. Ross (2009, p. 16), falando sobre esta Geografia, faz a seguinte afirmação:

³ O termo “primeira natureza” é usado por Corrêa (2005) para definir a natureza livre das interferências humanas em suas feições, é o que alguns podem chamar apenas de “Natureza”. A escolha da distinção destes termos se faz no intuito de destacar que sob nossa ótica a “Natureza” com interferência das ações humanas também constitui a natureza.

É objeto de preocupação da Geografia de hoje conhecer cada dia mais o ambiente natural de sobrevivência do homem, bem como entender o comportamento das sociedades humanas, suas relações com a natureza e suas relações sócio-econômicas e culturais.

Fazendo desta afirmação uma premissa, pode-se afirmar que cabe ao geógrafo buscar entender as complexas relações que regem os conflituosos interesses do homem frente à natureza. Vale destacar que ao se referir a tais interesses tem-se, como mote do pensamento, o entendimento de que o ser humano, ao se organizar no espaço, causa, muitas vezes, modificações de ordem estrutural, que poderão a longo ou curto prazo, provocar extremo prejuízo à própria organização do espaço das relações humanas.

Ao se pensar em natureza (meio ambiente), não se deve encarar o homem como externo a esta. Corrêa (2005, p. 154) chama a atenção para esse problema, dizendo que:

O meio ambiente não pode deixar de incluir o homem, mas um homem qualificado pelas suas relações sociais, sua cultura, seu ideário, mito, símbolos, utopias e conflitos. Afinal, toda conceituação que exclua o homem em sua complexa plenitude é falha, incompleta, pois alija o agente que simultaneamente é produtor e consumidor do meio ambiente, mas também, por meio dele algoz e vítima.

É verdade que no contexto da observação recém-citada o autor destaca que suas colocações estão amparadas nos argumentos e na visão geográfica humana. No entanto, seria mais do que correto extrapolar tais considerações e trazê-las ao âmbito da Geografia Física. Seria possível estudar padrões atuais de dispersão de espécies sem levar em consideração o forte poder seletor da espécie humana? Seria possível estudar processos de erosão e degradação do solo sem considerar as possíveis interferências humanas na área estudada? Ross (2009) afirma que, ao passar de simples coletor e caçador para agricultor, criador de rebanhos e abrigos, o homem começa inadvertidamente a alterar o “equilíbrio” e a funcionalidade dos ambientes naturais, privilegiando a expansão de um restrito número de espécies e causando a extinção de tantas outras. Cox e Moore (2009), sobre o mesmo assunto, vão além e ousam dizer que o homem não só selecionava as espécies, como também, por meio do transporte destas, causava a hibridização e o surgimento de novas espécies, a exemplo do trigo (*Triticum aestivum*). Desta forma, não considerar o poder do *Homo sapiens sapiens* na distribuição geográfica de outras espécies é tão academicamente delicado/perigoso como analisar o clima e o relevo sem considerar as fortes influências humanas na cobertura vegetal e na emissão de poluentes.

Neste sentido, entendendo o ser humano como um ser biológico, integrante do ecossistema e dotado de capacidade sociocultural para produzir e alterar o meio onde vive, pode-se afirmar que é papel do Geógrafo (e mais especificamente do biogeógrafo) estudá-lo como uma espécie ecológica, integrante dos vários ecossistemas terrestres, sem, contudo, desconsiderar sua complexidade.

Considerando as dificuldades de analisar o homem como ser integrante do ecossistema, dada sua forte influência e capacidade modificadora – superior a qualquer outra espécie –, foram criadas outras determinações para esse sistema que contém as ações humanas e suas modificações no espaço. O geossistema, neste panorama, denota essa maior influência do ser humano no espaço e distingue o espaço de ação do homem dos demais espaços, ditos “naturais”. Nascimento e Sampaio (2005) chamam esse (geo) sistema de ambiente natural que se configura com a interferência da sociedade humana e toda sua complexidade. Os autores ainda ressaltam a importância das diferenciações existentes entre o geossistema e o ecossistema, pois, segundo argumentam, “todo o geossistema engloba um ecossistema, sendo a recíproca uma inverdade” (p. 176).

Sobre as afirmações dos autores cabem algumas reflexões. Ora, é fato amplamente aceito no âmbito da academia que o ser humano integra o meio ambiente e compõe o ecossistema. Sendo esta uma verdade, na condição de componente do ecossistema, não seria de se esperar que suas ações também fossem consideradas naturais? O fato de uma dada espécie ter funções e dinâmicas distintas das outras, não a torna externa ao ecossistema; na verdade, o ecossistema parte da premissa da convivência de diversas espécies em uma dada localidade interagindo com o meio (RICKLEFS, 2010). Assim, deve-se considerar o humano como um ser biologicamente constituído, tal qual outras espécies, e que sua dinâmica social altera o “meio natural”, bem como fazem formigas e cupins, respeitando-se, é claro, as escalas de ação destes indivíduos distintos.

Muitas das relações sociais humanas extrapolam os ecossistemas, é verdade. As considerações de Nascimento e Sampaio (2005) estão corretas a este respeito, contudo, ainda restam dúvidas se apenas este fato é suficiente para embasar/justificar uma nova conceituação. Neste sentido, considerando que o geossistema estuda a ação do homem no ecossistema, é turvo, para nós, o motivo pelo qual esta nova terminologia foi criada visando descrever um sistema que enxergue o homem como elemento componente, mesmo já existindo algo que assim o considerava – o ecossistema. É fato que, muitas vezes, as definições de ecossistema não dão o devido destaque ao ser humano, porém, é um tanto precipitado considerar que o

geossistema é uma categoria puramente distinta do ecossistema e que a ideia de continência seria o norte da distinção entre eles, como afirmam Nascimento e Sampaio (2005).

É importante que fique claro que não é objetivo desta dissertação discutir minuciosamente o geossistema, nem sua correta ou incorreta aplicação nos estudos geográficos. O destaque anterior apenas foi feito por acreditar-se que proposições que, mesmo indiretamente, desconsideram o homem como componente do meio foram, por muito tempo, o norte da sociedade moderna. Tais pensamentos acabaram por levar a humanidade a um estágio de descompromisso com seu hábitat, causando profunda degradação do mesmo. Este status de interventor potente no meio influenciou o pensamento de autores como Cox e Moore (2009, p. 2), que, embora preocupados com a preservação ambiental, chegam a afirmar que, “do ponto de vista biológico, a evolução da espécie humana foi, de certo modo, uma catástrofe”, e, por este motivo, “seria irreal qualquer tentativa de síntese em Biogeografia que não considere os impactos humanos”. Ainda sobre este assunto, consideram que, desde sua origem, o ser humano é responsável por impactos ambientais de grande porte, como a extinção de mamíferos da mega fauna. Afirmações desse tipo, mesmo que sob uma ótica velada, reforçam a ideia de “homem externo ao meio” e puramente interventor, responsável pelos problemas ora discutidos.

Recentemente o homem vem sentindo os impactos das mudanças causadas no planeta e, por isso, lembrando-se de que é um elemento deste ambiente, vulnerável aos impactos tal qual outras espécies. Alterações na constituição e pureza do ar atmosférico podem ser ressaltadas como as mudanças de maior impacto na vida humana. Ao perceber-se que ações deliberadas de queima de combustíveis fósseis podem alterar a constituição da atmosfera e interferir diretamente na qualidade da vida humana, iniciou-se, a partir da década de 1960, um movimento que visava criar mecanismos de proteção do meio ambiente e recuperar áreas degradadas em todo o planeta. Tal movimento levava em consideração as recorrentes afirmações de que o homem integra o meio ambiente, e, proteger este último implica, diretamente, cuidar da qualidade de vida humana.

A sociedade moderna tem dado profundo destaque às questões referentes à qualidade de vida, porém,

tradicionalmente o Geógrafo vem estudando muito mais a morfologia urbana e o sítio das cidades do que as questões de qualidade de vida das sociedades urbanas. Estas só mais recentemente vêm sendo incorporadas à prática científica dos geógrafos (ROSS, 2009, p. 400).

Ciente desta deficiência busca-se aqui não apenas um estudo que interrogue/reflita sobre os impactos causados no meio pelas ações de uma sociedade que preza o lucro acima de todas as coisas. Este estudo pretende inferir alternativas que consigam conciliar as necessidades hodiernas e, as opções produtivas de menor impacto ao meio, sem incorrer no constante vezo acadêmico, das ciências humanas, do abandono do valor econômico das questões naturais.

Mesmo tendo, anteriormente, dispensado tempo, de escrita, para criticar algumas visões geossistêmicas, reforça-se aqui que não se constitui objetivo da presente perquisição a determinação do melhor (ou pior) uso do conceito de geossistema frente ao de ecossistema. Levantou-se tal questão, simplesmente, para justificar a escolha, nesta investigação, do entendimento do homem como componente do ecossistema, dotado de complexidade e distinção, componente ativo dos sistemas ecológicos terrestres, não merecedor, para este fim, de análise distinta dos demais componentes. E a partir desta ideia ampara-se, acima de tudo, no argumento de que é possível usar outras espécies para inferir problemáticas na qualidade de vida humana.

2.2 Problemas ambientais e respostas biológicas ...ou... Olhando os líquens e pensando os homens

É imperativa a ampliação do número de estudos que tenham como fonte inquietadora a condição da vida humana, e suas relações de dependência com a qualidade do ambiente. Por este motivo, profissionais das mais diversas áreas do conhecimento, na busca desta qualidade de vida, começaram a monitorar, por exemplo, a qualidade do ar em regiões mais densamente povoadas ou sob forte influência das ações humanas. No entanto, equipamentos que monitoram a qualidade atmosférica têm alto custo de aquisição e manutenção, além da necessidade de corpo técnico especializado para sua manutenção, diminuindo assim o acesso de forma substancial (CÁCERES, 1996).

Problemas como estes, que limitam financeiramente os avanços nos estudos de qualidade ambiental, acabam por impulsionar o desenvolvimento de técnicas que buscam baratear tal monitoramento. Desta forma, o monitoramento e a indicação biológica tem se tornado uma alternativa para pesquisadores que desejam aferir o impacto sofrido por determinadas áreas, sem que seja necessário o uso de monitores mecânicos.

Diversos estudos já apontam organismos da fauna e da flora como ótimos monitores e indicadores naturais da poluição ambiental. Estes estudos acabam determinando, a partir da resposta biológica ou de modificações no padrão de dispersão de determinadas espécies, interferências no hábitat e impactos, das mais variadas ordens, no meio ambiente (CÁCERES, 1996; MAZZITELLI et al., 2006; SILVA, R., 2002; SILVA, A., et al., 2009; SILVA, A., et al., 2010b).

Mota Filho et al. (2005) descrevem esses organismos como sendo biomonitores e bioindicadores do seu meio. É importante destacar que quase todos os seres vivos podem ser considerados bioindicadores do seu ambiente. Darwin, ao descrever o processo natural de evolução das espécies, indica que indivíduos de uma dada área sofrem mudanças em sua estrutura física, proporcionadas por variações ocorridas no meio físico. Assim, é possível, hoje, amparando-se nesta ideia, e entendendo que dadas mudanças, de origem antrópica, podem também causar mudanças adaptativas, concluir a viabilidade da bioindicação.

Hawksworth (1992 apud MOTA FILHO et al., 2005)⁴ caracteriza tais indivíduos da seguinte forma:

São considerados como bioindicadores organismos que expressam sintomas particulares ou respostas que indiquem mudanças em alguma influência ambiental, geralmente de forma qualitativa. Biomonitores são os organismos, cuja distribuição e populações são estudadas durante um certo espaço de tempo, e comparados com um modelo, onde os desvios do esperado são avaliados.

Posthumus (1983 apud MAZZITELLI et al., 2006)⁵, comentando o mesmo assunto, divide os organismos citados em dois grupos: “plantas indicadoras são aquelas que mostram claramente os sintomas e efeitos, indicando a possibilidade da presença de poluentes e, as plantas acumuladoras são as que facilmente retém compostos de poluentes específicos”.

A observação de determinadas espécies não é importante apenas para garantir a preservação delas, mas tornou-se, também, uma forma de fazer prognósticos a respeito dos seres humanos. Assim, quanto mais se conhece as outras espécies (animais ou vegetais), mais se valoriza a posição, na ordem natural, alcançada pela humanidade (COX; MOORE, 2009).

Neste contexto, diversos organismos já são descritos como ótimos indicadores e monitores ambientais. O posto de biomonitores é relegado a um grupo mais restrito de

⁴ HAWKSWORTH, D. L. Litmus tests for ecosystem health: the potential of bioindicator in the monitoring of biodiversity. In: SWAMINATHAN, M. S.; JANA, S. (Ed.). Biodiversity. **Implications for global food security**. Madras: Macmillan, Índia, v.17, p. 184-204, 1992.

⁵ POSTHUMUS, A. C. Higher plants as indicators and accumulators of gaseous air pollution. In: BEST, E. P. H.; HAECK, J. **Ecological indicators for the assessment of the quality of air, water, soil and ecosystems**. Dordrecht: D. Reidel, 1983. 263 p.

espécie, pois requer uma relação forte com o foco da análise. Hawksworth (1992 apud MOTA FILHO et al., 2005), sobre este assunto, afirma que “organismos com íntimas relações ecofisiológicas com a atmosfera, ao invés de com o seu substrato, são particularmente candidatos promissores para a bioindicação e, conseqüentemente, biomonitoramento da poluição do ar”. Os líquens, neste âmbito, são apontados em vasta bibliografia (ARAUJO et al., 2009; SILVA, R., 2002; SILVA, A., et al., 2009; SILVA, A., et al., 2010a, 2010b) como exemplos claros de ótimos biomonitores da qualidade do ar.

Inseridos no reino Fungi, mesmo tendo sua estrutura formada a partir de uma associação entre fungos e algas (ou cianobactérias), os líquens já são usados há algum tempo como indicadores de qualidade atmosférica (MAZZITELLI et al., 2006). Sua inserção no reino Fungi ocorre porque mais de 95% do volume de sua estrutura é composta pelo micobionte (fungo). Conforme Marcelli (2006), aproximadamente 20% das espécies de fungos hoje conhecidas encontram-se de alguma forma associadas a um fotobionte (alga ou cianobactéria).

Colonizadores de quase todos os ambientes do planeta, esses seres têm uma distribuição geográfica bastante diversa. Entretanto, não são frequentemente encontrados em áreas poluídas. Extremamente sensíveis a poluentes atmosféricos, eles ficam muito vulneráveis a alterações bruscas na constituição química do ar, uma vez que se nutrem higroscopicamente⁶ (MARCELLI, 2006). Esse tipo de nutrição torna-os pioneiros na colonização de rochas, e, graças à sua interação com o substrato, agentes fundamentais na gênese dos solos.

Não se tenha como contraditórias as afirmações anteriores. Embora o líquen possua nutrição higroscópica, ele traça forte interação com o substrato, pois a ação de suas hifas⁷ provoca forte intemperismo biofísico na rocha, auxiliando, assim, o processo de pedogênese, sem que haja, contudo, uma significativa troca de nutrientes.

Tanto as observações dos líquens como o uso destes para a bioindicação ambiental são bastante antigos. Sobre isso, Mota Filho et al. (2005) dizem que:

Em 1866, Nylander notou que alguns líquens encontrados em certas espécies de árvores nos arredores de Paris não eram encontrados nas mesmas árvores que estavam no centro da cidade; ele concluiu, então, que estes líquens haviam existido anteriormente na área urbana porém haviam sido mortos

⁶ Esse tipo de nutrição (nutrição higroscópica) está baseada na absorção de todos os nutrientes, necessários para a sobrevivência da espécie, do ar atmosférico. No caso do líquen, tal fato é possível porque, graças à associação existente, fungo e alga (ou cianobactérias) garantem reciprocamente condições de sobrevivência, necessitando apenas da umidade ambiente e um pouco dos nutrientes dispersos.

⁷ Conjunto de filamentos componentes do talo fúngico, que serve, também, como fixador no substrato.

pela ação de poluentes presentes na atmosfera (Denison, 1973). Este liquenologista escandinavo foi quem primeiro sugeriu a utilização de líquens como bioindicadores da qualidade do ar (Seaward, 1993). Os métodos para se estudarem os efeitos da poluição atmosférica em líquens têm sido, principalmente, fitossociológicos e ecofisiológicos. Por estes métodos é possível relacionar a presença ou ausência de espécie de líquens, seu número, sua frequência, cobertura, sintomas de danos externos e internos, com o grau de poluição da área em estudo.

Nash III (2008) confirma que líquens vêm sendo reconhecidos como seres bastante sensíveis à poluição do ar, e que, já no século XIX, observações independentes na Inglaterra e Paris documentaram que nos arredores de áreas urbanas eles estavam desaparecendo.

Sobre esse tipo de observação, Mazzitelli et al. (2006) afirmam que é possível observar mudanças já na coloração do talo liquênico, como variações para tons mais claros, e citam Brodo (1961)⁸, que conseguiu identificar tais variações morfológicas.

Carreras et al. (1998 apud SILVA, 2002) transplantaram amostras de *Usnea ambyoclada* para cinco zonas de controle na cidade de Córdoba (Argentina) com altos níveis de poluição industrial e automotiva. Após o período de exposição, os autores concluíram que os teores de clorofila foram bastante afetados, o que indica claramente impacto direto na fisiologia liquênica.

Guidotti (2003) analisou a presença de hidrocarbonetos em espécies de líquens transplantadas, de áreas saudáveis, para 18 pontos na cidade de Rieti, na Itália. Após o período de 5 meses foi feita a coleta e análise do material para determinar a concentração de hidrocarbonetos nas amostras e observou concentrações consideráveis em todas as amostras.

Cruz et al. (2009) ao submeter *Cladia aggregata*, em condições laboratoriais a formaldeído, muito utilizado na indústria como esterilizante, percebeu que alterações na produção de ácido barbático, típico desta espécie, e produção de metabólitos intermediários, confirmando a resposta liquênica a poluentes dispersos no ar.

Käffer et al. (2012) observaram que líquens colocados próximos a ambientes urbanos na cidade de Porto Alegre, sul do Brasil, demonstraram, após exposição, absorção de metais pesados e acúmulo de hidrocarbonetos. Destaca-se que, dentre os 18 tipos de hidrocarbonetos analisados pelos autores, 15 compõem a lista de prioridades da *US Environmental Protection Agency* (USEPA), por serem considerados nocivos aos seres humanos. Estudos como estes

⁸ BRODO, I. M. Transplant experiments with corticolous lichens using a new technique. **Ecology**, Durham, v. 42, n. 4, p. 834-841. 1961.

deixam clara a viabilidade dos líquens como espécies indicadoras e monitoras do ambiente, especificamente da qualidade do ar.

2.3 *Cladonia verticillaris* ...ou... Um biomonitor notoriamente conhecido

Dentre as diversas espécies de líquens já catalogadas está a *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., que pertence à família *Cladoniaceae* (MARCELLI, 2006) e é uma espécie endêmica do Brasil, podendo ser encontrada em toda a costa leste do país e em áreas do interior do Nordeste (PEREIRA, E., 1998). Alvo de diversos estudos é utilizada como biomonitor há muito tempo, em especial pelo Grupo de Liquenologia Aplicada da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (CÁCERES, 1996; SILVA, 2002; FREITAS, 2006; MOTA FILHO et al., 2007; PEREIRA, I., 2011; SILVA, B., 2013).

Cáceres (1996) usou *C. verticillaris* para aferir os níveis de poluição no campus da UFPE e na cidade do Recife-PE, com ênfase na poluição proveniente de veículos automotores. Após período de exposição, foi possível determinar as áreas de maior impacto. Silva et al. (2009), em atualização do referido trabalho, concluíram que as áreas com maior fluxo de veículos foram as que provocaram degradação mais alta nas amostras de líquens analisadas.

Silva, R. (2002) expôs *C. verticillaris* a uma área urbana do município de Jaboatão do Guararapes-PE e comparou resultados das análises com as informações de monitores mecânicos da qualidade atmosférica. Os resultados mostraram que o líquen é capaz de perceber e demonstrar, por variações em sua morfologia, até níveis relativamente pequenos de metais pesados e outros materiais dispersos no meio.

Freitas (2006) ao transplantar *C. verticillaris*, coletada em áreas saudáveis, para nove pontos distintos dentro do complexo portuário de Suape – PE conseguiu identificar, por meio de respostas fisiológicas, áreas de profundo impacto. Indicou também que a direção predominante dos ventos é um contundente fator de dispersão dos poluentes, destacando a necessidade de estudos de dinâmica atmosférica antes da instalação de unidades industriais.

Mota Filho et al. (2007) depois de transplantarem *C. verticillaris* para locais próximos a unidades de processamento de chumbo no município de Belo Jardim-PE, perceberam que líquens transplantados apresentaram deterioração de seu principal componente (ácido fumaprotocetrárico) e danos estruturais consideráveis, observados por microscopia eletrônica de varredura. Os autores também destacaram que o raio de dispersão do chumbo, pela

atmosfera, não ultrapassou os 200 metros uma vez que as amostras localizadas a distâncias superiores das fontes emissoras ou que não estavam no caminho de dispersão por correntes de ar, não se mostraram tão impactadas.

Villarouco et al. (2007) observaram que amostras *C. verticillaris* submetidas a estireno (C_8H_8) e ciclohexano (C_6H_{12}), em condições laboratoriais, demonstraram, após 15 dias da montagem do experimento, danos a sua morfologia, com exposição das hifas corticais, produção de metabólitos intermediários e diminuição considerável do ácido fumaprotocetrárico.

Santos (2011), ao observar talos de *C. verticillaris* expostos a áreas de plantio de cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco, identificou um aumento no número de metais pesados, indicando a acumulação, na estrutura do líquen, dos poluentes ambientais.

Pereira, I. (2011), ao analisar líquens expostos também a áreas de cultivo e processamento de cana-de-açúcar, na zona da mata pernambucana, observou variações consideráveis na estrutura fisiológica liquênica nas amostras que ficaram nos vetores de dispersão da unidade de processamento da cana. Ainda nesse estudo, o autor percebeu que na área controle, longe de fontes emissoras de poluentes por atividade canavieira, as amostras que ficaram próximas à estrada de grande circulação de veículos automotores apresentaram alterações em sua estrutura, o que confirma a grande sensibilidade do líquen a variações no ambiente.

Oliveira (2011) ao estudar áreas industriais conseguiu perceber que a *C. verticillaris* respondeu de forma significativa indicando pontos de poluição que poderiam trazer risco a saúde humana. Em trabalho paralelo, a autora identificou, em condições laboratoriais que a resposta observada, durante o estudo, se deu predominantemente pela ação da pirrolidina (C_4H_9N), composto utilizado no processo de fabrico da indústria analisada.

Silva, B. (2013) usou *C. verticillaris* para monitorar, em condições laboratoriais, a resposta biológica a policloreto de alumínio e outros coagulantes utilizados no tratamento de água pela Companhia pernambucana de saneamento. Após o período de exposição líquen analisado demonstrou perda progressiva dos pigmentos fotossintéticos e diminuição do ácido fumaprotocetrárico com aumento dos metabólitos intermediários.

2.4 Diesel ...ou... Uma energia potencialmente agressiva

A produção e o consumo de energia são fundamentais para todos os seres. A espécie humana, não diferentemente dos outros componentes do ecossistema, tem a necessidade de consumir energia para sobreviver. Com o desenvolvimento tecnológico, o ser humano começou a consumir energias das mais variadas formas. Com o advento da revolução industrial, a necessidade de obtenção de energia para a produção de bens de consumo aumentou exponencialmente. O grande problema no processo de obtenção de energia é a baixa utilização do potencial energético total em alguns processos. Rudolf Diesel admite em seu livro *Die Entstehung des Dieselmotors* (1913 apud KNOTHE, 2006)⁹, que sua primeira provocação para a invenção da máquina, que viria a receber o seu nome, surgiu quando, durante uma conferência sobre termodinâmica em Munique, ouviu que as máquinas a vapor convertiam apenas 6-10% do poder calorífico do combustível em trabalho. Diesel se propôs a estudar a possibilidade de criação de uma máquina que conseguisse converter 100% de sua energia em trabalho (KNOTHE et al., 2006). Foi a partir dessas investigações que Rudolf inventou o motor a diesel. Este se diferencia de outros motores de combustão interna, como o movido a gasolina, porque, embora não tenha tanta força de explosão, seu tempo de expansão é bem mais longo, fazendo com que o curso do pistão no motor seja consideravelmente maior e tornando-se mais adequado para uso em veículos de grande porte como ônibus e caminhões.

Nos Estados Unidos da América, os motores movidos a diesel em veículos de transporte rodoviário consomem mais de 30 bilhões de galões de combustível por ano, sendo praticamente todo esse consumo devido à frota de caminhões. Os veículos de passeio que utilizam óleo diesel correspondem a menos de 1% da frota nacional. Já na Europa, esse percentual chega a 33% (KNOTHE et. al., 2006). No Brasil, cerca de 41 bilhões de litros de diesel são utilizados no setor de transportes e 8 bilhões de litros na agropecuária, com uma tendência de aumento para 75 e 18 bilhões de litros, respectivamente, em 2030 (PNE 2030, 2007).

Embora quando comparado aos motores movidos a gasolina, o motor a diesel emita menos Hidrocarbonetos (HC) e Monóxidos de Carbono (CO), ele acaba por emitir bem mais Óxidos de Nitrogênio (ON_x) (KNAPP, 2010), o que tem garantido o diesel no local de forte poluente atmosférico.

⁹ DIESEL, R.. *Die entstehung des dieselmotors*. Berlin: Verg Von Julius Springer, 1913.

Assim, ciente da tendência de aumento progressivo do consumo de óleo diesel no Brasil e no mundo e, das problemáticas advindas dos poluentes emanados como produto da queima desse combustível, é importante a iniciativa acadêmica de produção de combustíveis alternativos e menos poluentes.

2.5 Biocombustíveis ...ou... A esperança de um mundo renovável

Diante da realidade anteriormente apresentada e em paralelo às pesquisas de biomonitoramento e bioindicação citadas, estudos que buscam formas alternativas de exploração dos recursos naturais vêm sendo desenvolvidos (BUTTERBACH-BAHL; KIESE, 2013; GODOI; OLIVEIRA JUNIOR; MATAI, 2012; MASIERO; LOPES, 2008). A busca por combustíveis alternativos aos convencionais, derivados de petróleo, surgiu da necessidade de prevenção às famosas crises do petróleo, que deixaram os países importadores em situação deveras delicada. Com o passar do tempo, o medo de uma nova crise foi diminuindo e dando lugar a preocupações com as condições ambientais do planeta. Diversos estudos demonstraram que a ação humana e a queima de combustíveis fósseis, em larga escala, alteraram a estabilidade climática do planeta, deixando diversas populações mais vulneráveis a eventos catastróficos.

Movidos pelas inquietações anteriormente citadas, cientistas de todo o planeta começaram a desenvolver combustíveis renováveis, a partir de organismos vegetais e animais, que foram chamados de biocombustíveis. Estes biocombustíveis se destacaram em um primeiro momento por sua renovabilidade. Uma vez produzidos a partir de organismos vivos, poderiam ser facilmente cultivados e sua produção seria garantida por muitas gerações. É neste contexto que surge o bioálcool, o qual, no Brasil, é utilizado até hoje como combustível automotivo. Produzido a partir da cana-de-açúcar e de outras espécies vegetais, como o milho, o bioálcool é renovável e calorificamente viável para motores automotivos específicos. É bem verdade que o número de críticas ao modo de produção da cana, no Brasil, e aos impactos sociais gerados são tão grandes quanto as áreas cultivadas, contudo este não é foco deste trabalho.

Outro grande expoente dos biocombustíveis que só veio ao conhecimento do grande público recentemente é o biodiesel – nome dado a ésteres alquílicos de ácidos graxos desde que atendam a certos parâmetros de qualidade (DABDOUBE; BRAZEL; RAMPIN, 2009).

Ele possui origem biológica (vegetal ou animal) e pode ser usado como substitutivo do diesel comum (petróleo), apresentando capacidade energética equivalente.

O biodiesel já era usado em 1938 na linha comercial de passageiros que ligava as cidades de Louvain e Bruxelas, na Bélgica. Tal feito foi possível pela ideia do pesquisador belga Charles George Chavanne, que propôs a transformação de um óleo vegetal em ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, e posterior uso em motores de combustão interna. Porém, só recebeu a nomenclatura atual com a publicação de um artigo pelo cientista chinês R. Wang no ano de 1988, intitulado “*Development of Biodiesel Fuel*” (DABDOUBE; BRAZEL; RAMPIN, 2009).

No Brasil, a primeira patente requerida acerca de um processo de transesterificação ocorreu em 1980 (DABDOUBE; BRAZEL; RAMPIN, 2009). Tal fato deixa claro o quão negligente fomos ao subutilizar, por cerca de 30 anos, esses recursos energéticos naturais renováveis, extremamente abundantes em nosso país, para este fim.

No que diz respeito à viabilidade econômica da cadeia produtiva do biodiesel, Leiras; Hamacher; Scavarda (2007) afirmam que é economicamente viável a produção em larga escala e que esta é internacionalmente competitiva. Segundo os autores, os preços que podem ser praticados nas usinas brasileiras se mostram inferiores ao de outros países, como a Alemanha.

O biodiesel conseguiu um lugar de destaque no cenário internacional por emitir pelo menos 50% do material particulado em relação ao diesel comum, 98% menos enxofre, podendo ser considerado virtualmente livre desse elemento. Também é biodegradável, possui um alto teor de cetonas, um teor médio de oxigênio e maior viscosidade associada a um ponto de fulgor maior que o do diesel de petróleo – petrodiesel (POMPELLI et al., 2011).

Confirmando essas ideias, Ramos et al. (2003) elegem o biodiesel como combustível verdadeiramente sustentável dada suas baixas taxas de emissão de poluentes, em comparação ao diesel comum (petrodiesel), e sua capacidade de absorver, durante a fase do produção das lavouras, o dióxido de carbono emanado. Ainda confirmam que o diesel de origem biológica não emite gases sulfurados (mercaptanas e dióxido de enxofre), fonte de grandes problemas quando emanados em grande quantidade para natureza.

Estas pesquisas, e tantas outras não citadas, têm feito com que o biodiesel se consolide ao longo do tempo como combustível ecológico. Porém, é necessário um pouco de precaução no que diz respeito à produção de novos combustíveis.

Com o advento da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, e a consequente inserção do biodiesel na matriz energética brasileira, a demanda por este tende a aumentar exponencialmente. Segundo Amorim (2005 apud SARTORI, 2009), a partir de 2013, com a exigência da mistura de 5% de biodiesel no diesel comum, serão necessários aproximadamente 2,4 bilhões de litros desse biocombustível. Porém, 5% talvez ainda represente um quantitativo tímido demais perante a necessidade de redução da emissão de poluentes atmosféricos na dinâmica das grandes cidades.

Neste contexto, embora já consigamos ensaiar uma produção em larga escala dos biocombustíveis (e mais recentemente do biodiesel) e reconheçamos sua eficiência energética e renovabilidade, estudos que remetam à ação desses produtos, puros ou misturados, sobre organismos vivos são escassos e podem ratificar a viabilidade de seu uso em larga escala. Assim, levando-se em consideração que a eficiência dos líquens como biomonitores da qualidade ambiental é amplamente difundida, qualquer estudo que utilize estes organismos para aferir os níveis de poluição provocados por motores movidos a biodiesel poderá contribuir sobremaneira para o conhecimento do seu real impacto sobre os organismos terrestres, dentre os quais se destaca o ser humano.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a resposta biológica do líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. a poluentes emanados por motor estacionário movido a biodiesel B5 (5% de biodiesel diluído em 95% de petrodiesel), em condições laboratoriais.

3.2 Específicos

- Analisar os teores de pigmentos fotossintéticos da espécie e como estes se comportam após exposição aos poluentes;
- Analisar a produção de fenóis pela espécie, durante o período pós-exposição;
- Avaliar a vitalidade celular, das algas, após o experimento;
- Determinar se em períodos curtos de exposição o líquen já demonstra respostas negativas e danos consideráveis em sua estrutura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e armazenamento do material liquênico

O líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. foi coletado no município de Alhandra-PB, na quantidade de 360 gramas. O referido município encontra-se localizado na Mesorregião da Mata do Estado da Paraíba e possui uma área de 183 km² e altitude de 49 metros. Inserido na unidade geoambiental dos Tabuleiros Costeiros¹⁰, possui um relevo formado por platôs de origem sedimentar e solos do tipo Latossolo e Argissolo. Apresenta um clima do tipo tropical chuvoso com verão seco, e uma vegetação predominantemente do tipo Floresta Subperenifólia (CPRM – Serviço Geológico do Brasil, 2005). A escolha de tal município para coleta do material aconteceu em face da abundante oferta de material e por sua área não ser considerada sob forte influência de agentes poluidores (Figuras 1 e 2).

Figura 1 – *Cladonia verticillaris* (Raddi)
Fr. em campo



Foto – Iwelton Pereira (2013)

Figura 2 – Local de realização da coleta de
Cladonia verticillaris (Raddi) Fr. no
município de Alhandra-PB



Foto – Iwelton Pereira (2013)

O material coletado foi acondicionado em embalagens de papel e levado até o Laboratório de Geografia Ambiental do Núcleo de Estudos do Meio Ambiente (LAGEAM/NEMA) do Centro de Filosofia e Ciências Humanas (CFCH) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde foi deixado para secar, à temperatura ambiente (28 ± 3

¹⁰ “Os Tabuleiros Costeiros são definidos como a própria etimologia indica, em função da predominância de formas tabulares e da proximidade do litoral, e podem ser diferenciados, por meio das formas erosivas, ou seja, segundo os processos de erosão atuantes, estando divididos em Tabuleiros Costeiros caracterizados por superfície tabular erosiva e Tabuleiros Costeiros caracterizados por superfície pediplanada.” (PEREIRA, V.; CESTARO, 2012, p. 391)

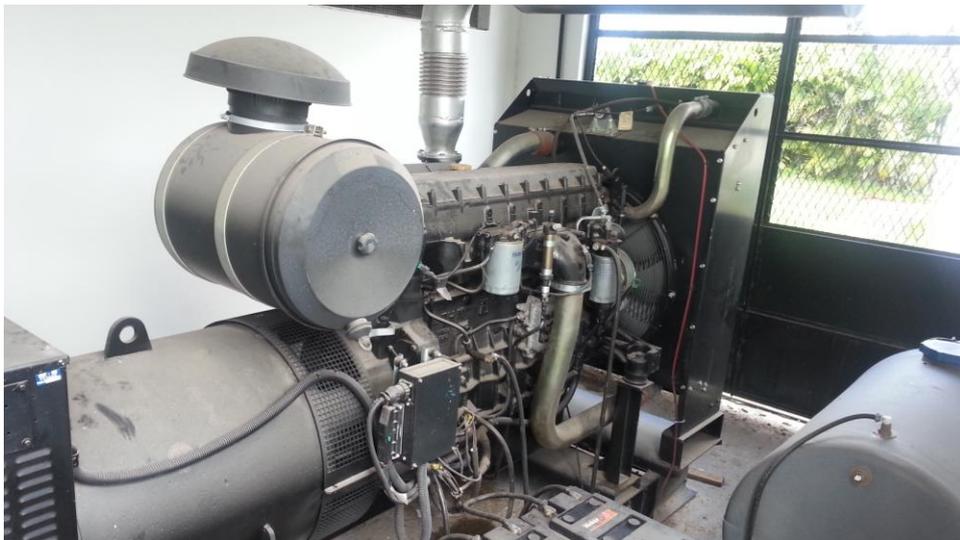
°C), e limpo. A limpeza foi realizada com o auxílio de luvas de látex para procedimento não cirúrgico e pinça de metal, sendo retirados todo tipo de folha, galhos secos, terra ou qualquer outro material estranho à estrutura do líquênica.

Uma amostra do líquen em condições naturais (grupo controle de campo) foi submetida à extração de clorofila e feofitina e fenóis (ácidos fumaprotocetrárico, protocetrárico e atranorina) para determinação das condições fisiológicas do material coletado. Estas informações serviram de base para as análises dos dados obtidos durante o estudo como controle de campo, em tempo zero.

4.2 Montagem dos experimentos

Após o processo de limpeza, o material líquênico foi pesado e separado em grupos amostrais (descritos a seguir), os quais foram dispostos a diferentes distâncias do escapamento de motor estacionário FIAT, modelo C78 ENT, F2B, de ciclo diesel a 4 tempos acoplado a grupo gerador de energia (Figura 3), abastecido com diesel B5¹¹. Toda a exposição do material foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), com a estrutura da Divisão de Biocombustíveis daquela instituição.

Figura 3 – Motor estacionário acoplado a grupo gerador. Utilizado na combustão do biodiesel B5, durante o experimento



Localização – Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife, PE.

Foto – Iwelton Pereira (2013)

O experimento foi conduzido em três etapas, conforme exposto a seguir.

¹¹ 5% de biodiesel diluído em 95% de petrodiesel.

Experimental 1: durante essa etapa 9 amostras contendo, cada uma, 10 gramas do material liquênico foram borrifadas com água deionizada e colocadas sobre lâminas de papel alumínio (método alterado nos outras fases do experimento) na direção do fluxo de escapamento do motor estacionário, a distâncias de 50 centímetros (D1), 1 metro (D2) e 2 metros (D3), sendo três amostras para cada distância. Após três minutos de exposição, o motor foi desligado e as amostras foram levadas a laboratório e colocadas sob cúpula de vidro em local em que pudessem receber luz solar indireta. Ao conjunto das cúpulas contendo material exposto foram adicionadas outras três contendo líquen não exposto para que atuassem como grupo controle do experimento. O material liquênico recebeu ao longo de 60 dias borrifos de água deionizada (10 mL), duas vezes por semana.

Para a realização dos experimentos nos momentos seguintes se fez necessária uma segunda ida a campo para coleta de material. Tal coleta ocorreu no mesmo local que a primeira.

Experimental 2: durante essa etapa 9 amostras contendo, cada uma, 10 gramas do material liquênico foram borrifadas com água deionizada e colocadas em sacos de náilon na direção do fluxo de escapamento do motor estacionário, a distâncias de 50 centímetros (D1), 1 metro (D2) e 2 metros (D3), sendo três amostras para cada distância. Decorridos trinta minutos de exposição, o motor foi desligado e as amostras foram levadas a laboratório e dispostas sob cúpula de vidro em local em que pudessem receber luz solar indireta. Ao conjunto das cúpulas contendo material exposto foram adicionadas outras três contendo líquen não exposto para que servissem como controle laboratorial. O material liquênico recebeu ao longo de 60 dias borrifos de água deionizada (10 mL), duas vezes por semana.

Experimental 3: superados os dois momentos anteriores, para ajustes do método, optou-se por expor o líquen por três tempos (15 minutos, 30 minutos, 1 hora) em duas distâncias (1 metro e 3 metros). Tal escolha se deu por entender que mesmo o líquen já respondendo com três minutos de exposição seria melhor alongar esse tempo no sentido de tentar perceber, com maior nitidez, os impactos sofridos após quinze minutos e, a partir desse tempo, dobrar as exposições. Decidiu-se reduzir o número de distâncias por acreditar que os 50 centímetros, entre D1 e D2 das exposições Experimental 1 e 2, poderiam sofrer mais influência da temperatura (do escapamento) do que dos gases. Eliminou-se então a distância 1 (50 centímetros), permanecendo apenas as distâncias 2 (1 metro) e aumentando-se 1 metro na distância 3 (de 2 para 3 metros). Decorridos os primeiros 15 minutos (T1) de exposição do material liquênico, 24 gramas foram retiradas das amostras de cada distância (48 gramas no

total) e levadas a local onde não pudessem mais receber influência direta dos gases do escapamento do motor. Após mais 15 minutos (isto é, 30 minutos depois do início da exposição do material), outros 24 gramas das amostras de cada distância foram retiradas e levadas à local fora da zona de influência direta do motor. Passados os últimos 30 minutos (1 hora do início), o motor foi desligado e o último grupo recolhido. Todo o material foi levado a laboratório e separado em cúpulas de vidro de acordo com o tempo de exposição e a distância da saída do escapamento (Figuras 4 e 5). Cada amostra de 24 gramas foi dividida em três cúpulas contendo 8 gramas, para fins de repetição das análises. Ao grupo das cúpulas com líquen exposto aos gases do escapamento foram adicionadas outras três cúpulas (com 8 gramas de líquen cada), para fins de controle laboratorial. Todas as cúpulas receberam ao longo de 30 dias borrifos de água deionizada (10 mL), duas vezes por semana.

Figura 4 – Saída do escapamento do motor estacionário e líquen durante a exposição aos gases da queima do biodiesel B5.



Foto – Iwelton Pereira (2013)

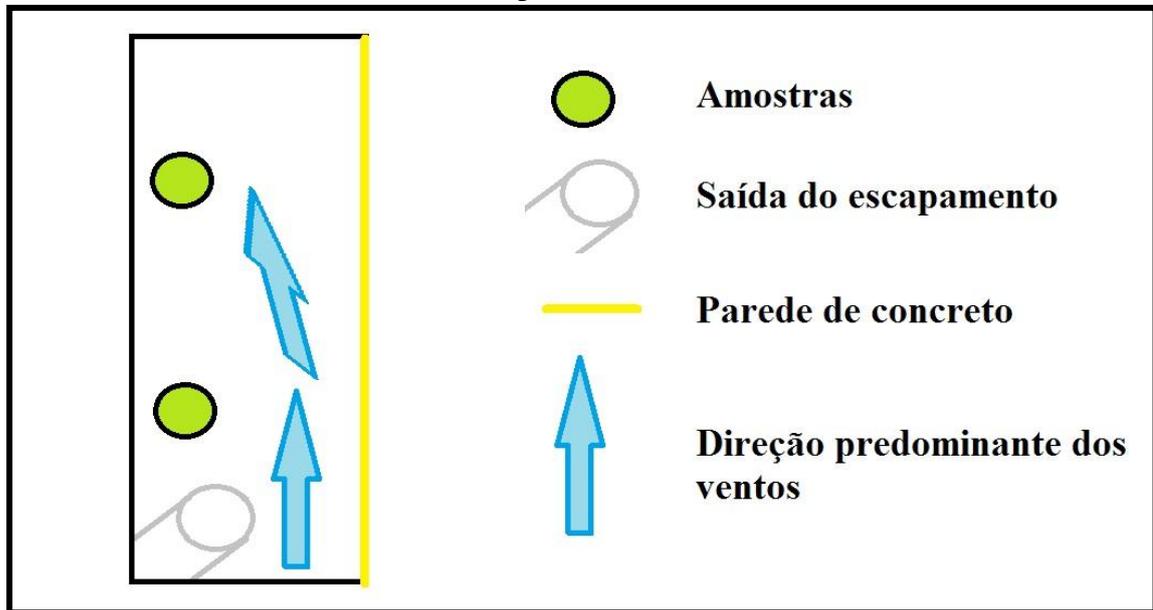
Figura 5 – Saída do escapamento do motor estacionário e líquen durante a exposição aos gases da queima do biodiesel B5



Foto – Iwelton Pereira (2013)

Em se tratando da distância entre o material e a fonte poluidora durante a exposição, é importante destacar que se tomou o cuidado de colocar o escapamento de maneira que sua saída formasse um ângulo de 45° com as amostras liquênicas (Figuras 4 e 13). Tal método foi adotado para que o calor do escapamento não influísse de forma contundente os resultados, uma vez que, conforme sugerem Streit et al. (2005), elevações consideráveis de temperatura influenciam diretamente na degradação da clorofila.

Figura 6 – Esquema da disposição das amostras de *Cladonia verticillaris*(Raddi) Fr. durante a exposição a biodiesel B5, e da influencia dos ventos na dispersão de poluentes



Desenho – Iwelton Pereira (2014)

4.3 Processamento e análise das amostras

Decorrido o tempo de acondicionamento, foi realizada coleta do material para análises das condições fisiológicas do material liquênico. Os grupos Experimental 1 e 2 (3 minutos e 30 minutos) tiveram duas coletas (30 e 60 dias) enquanto que o grupo experimento só teve uma coleta (30 dias). O material controle de campo *in natura* foi submetido a todas as análises aqui descritas. O processamento das amostras ocorreu no Laboratório de Geografia Ambiental do Núcleo de Estudos do Meio Ambiente (LAGEAM/NEMA) do Centro de Filosofia e Ciências Humanas (CFCH) e no Laboratório de Bioquímica de Produtos Naturais do Centro de Ciências Biológicas (CCB), ambos na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.3.1 Análise de clorofila e feofitina

Amostras de 500 mg de *C. verticillaris* foram picotadas a mão livre, com tesoura esterilizada, colocadas em tubos de ensaio previamente envolvidos em papel alumínio (para evitar a entrada de luz) e infusas em dimetilsulfóxido – $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ – a 100%. Os tubos de ensaio foram deixados à temperatura ambiente (28 ± 3 °C) em local abrigado da luz por 48

horas (POMPELLI et al., 2013). Após este tempo, os extratos foram filtrados e submetidos à análise em espectrofotômetro BIOCHORM[®], modelo Libra S22, nos comprimentos de onda de 536, 630, 647, 664, 666 e 691 nm, para quantificação de clorofilas (a), (b), (c), (d) e total.

Realizadas as leituras, os resultados foram aplicados em fórmulas matemáticas para os cálculos dos teores de clorofila (a), (b), (c) e (d) (POMPELLI, 2013) e feofitinas (a) e (b) (VERON 1960), dados em mg L⁻¹ descritas a seguir:

$$\text{Clorofila (a): } (-0.3319 \cdot \Delta_{630}) - (1.7485 \cdot \Delta_{647}) + (11.9442 \cdot \Delta_{664}) - (1.4306 \cdot \Delta_{691})$$

$$\text{Clorofila (b): } (-1.2825 \cdot \Delta_{630}) + (19.8839 \cdot \Delta_{647}) - (4.886 \cdot \Delta_{664}) - (2.3416 \cdot \Delta_{691})$$

$$\text{Clorofila Total: } (21.3877 \cdot \Delta_{630}) + (10.3739 \cdot \Delta_{647}) + (5.3805 \cdot \Delta_{664}) + (5.5309 \cdot \Delta_{691})$$

$$\text{Feofitina (a): } 21,67 \cdot \Delta_{666} - 17,42 \cdot \Delta_{536}$$

$$\text{Feofitina (b): } 31,90 \cdot \Delta_{536} - 13,40 \cdot \Delta_{666}$$

Onde Δ é a média dos resultados das leituras feitas em cada comprimento de onda (ver exemplo na Tabela 1), e o número que segue o Δ é o respectivo comprimento de onda a ser analisado.

Tabela 1 – Exemplo da planilha utilizada para calcular os teores de clorofila e feofitina de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.

Comprimentos de onda	Controle						
	536	630	647	664	666	691	Total
Leitura 1	0,736	0,508	0,615	0,994	1,009	0,391	4,253
Leitura 2	0,734	0,509	0,615	0,994	1,010	0,393	4,255
Leitura 3	0,734	0,510	0,617	0,995	1,010	0,392	4,258
Média	0,735 ¹²	0,509	0,616	0,994	1,010	0,392	4,255

Fonte – Iwelton Pereira (2014)

A utilização desta técnica se justifica no entendimento de que a produção da clorofila (produto da fotossíntese) é fundamental para a existência dos organismos fotossintetizantes (como a alga, componente do líquen), e que a feofitina é um produto da degradação desta. Assim, quantificar tais produções significa perceber possíveis impactos na fisiologia do organismo.

¹² Resultado da soma das Leituras 1, 2 e 3 dividida pelo número de Leituras [(L1+L2+L3)/3], que deverá ser multiplicado pela constante da fórmula (ex: 12,7; 2,69; 22,9 etc.), seguindo o modelo acima descrito para cálculo dos teores de clorofila (a), clorofila (b), feofitina (a), feofitina (b).

4.3.2 Análise de fenóis

A quantificação fenólica (ácidos protocetrárico, fumaprotocetrárico e atranorina) torna-se tão interessante quanto a dos compostos descritos no tópico anterior, uma vez que tais ácidos apenas são produzidos de forma balanceada na presença de condições mínimas de salubridade do ambiente. Diante disso, um grama das amostras foi submetido à extração orgânica por esgotamento, usando 10 ml de éter dietílico [(C₂H₅)₂O], clorofórmio (CHCl₃) e acetona (C₃H₆O), sucessivamente, com exposição de duas horas para cada composto. Assim, o líquen foi macerado em almofariz, depositado em erlenmeyer (Figura 6) e infuso em éter dietílico por duas horas. Posteriormente, o éter foi filtrado e guardado em tubo de vidro esterilizado e pesado em balança de precisão SHIMADZU[®], modelo AUY220. O material liquênico restante foi infuso em clorofórmio por mais duas horas. Decorrido este tempo, o clorofórmio foi filtrado e guardado no mesmo tubo de vidro que o éter dietílico. O material foi finalmente infuso em acetona, por duas horas, a qual foi posteriormente filtrada e depositada no tubo comum às outras extrações. O material liquênico restante pós-extração foi descartado. Durante toda a extração o material infuso nos reagentes manteve-se em câmara fria.

Figura 7 - Erlenmeyer e tubos de vidro durante extração dos fenóis liquênicos de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.



Foto – Iwelton Pereira (2013)

Após a obtenção dos extratos orgânicos, os tubos de vidro foram deixados para secar à temperatura ambiente (28 ± 3 °C). Uma vez secos, os tubos foram novamente pesados para determinação do peso do extrato neles armazenados. Tais extratos foram diluídos em acetona

(100%) a 1 mg mL^{-1} e posteriormente lidos em espectrofotômetro BIOCHORM[®], modelo Libra S22, nos comprimentos de onda de 210, 254 e 366 nm, para quantificação dos ácidos, conforme método descrito por Vasconcelos (2009), com algumas alterações. Cada extrato foi lido três vezes, de forma similar ao procedimento utilizado nas leituras de clorofila. A média dos valores obtidos em cada comprimento de onda foi submetida às seguintes fórmulas para quantificação individual de cada composto de *C. verticillaris*:

$$\text{Ácido Fumaprotocetrárico: } \mu\text{g mL}^{-1} = 53,4*\Delta_{254} - 17,5*\Delta_{210} + 29,26*\Delta_{366}$$

$$\text{Ácido Protocetrárico: } \mu\text{g mL}^{-1} = 47,5*\Delta_{366} - 0,23*\Delta_{210} + 0,53*\Delta_{254}$$

$$\text{Atranorina: } \mu\text{g mL}^{-1} = 3,9*\Delta_{210} - 1,72*\Delta_{366} + 0,05*\Delta_{254}$$

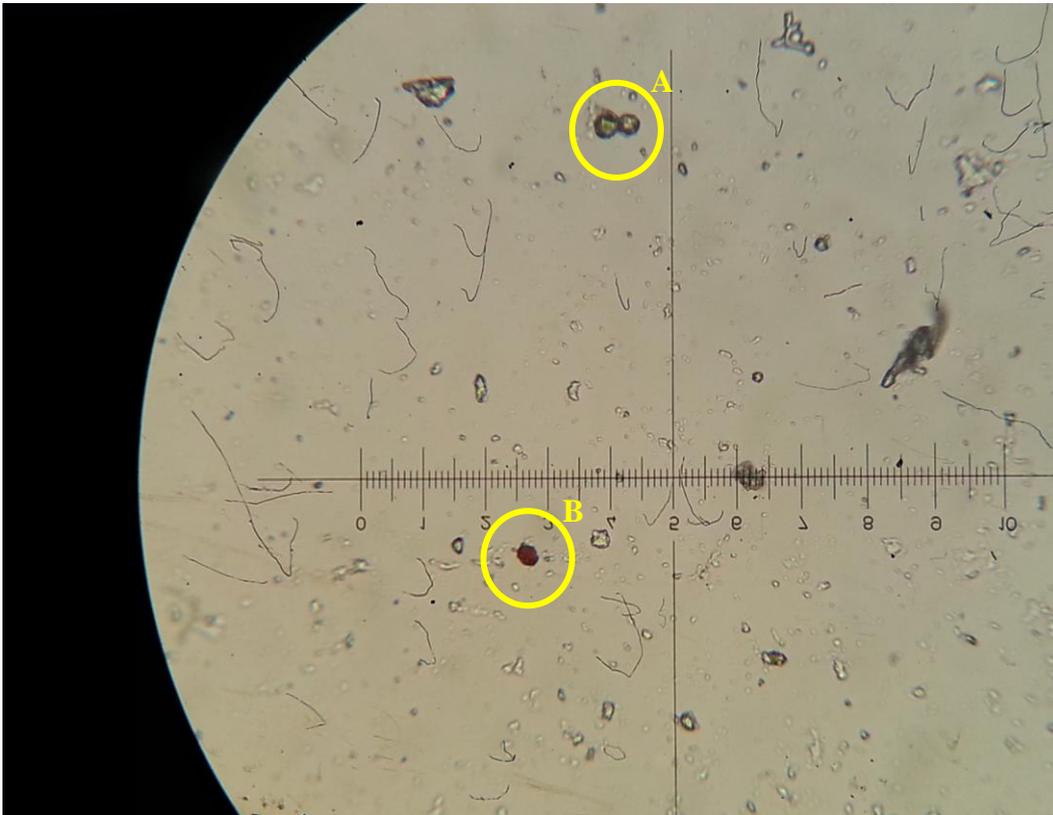
Onde Δ é a média dos resultados das leituras feitas em cada comprimento de onda (ver exemplo na Tabela 1), e o número que segue o Δ é o respectivo comprimento de onda a ser analisado.

4.3.3 Avaliação da vitalidade celular

4.3.3.1 Vermelho Neutro

As amostras expostas, controle de campo e laboratório foram submetidos à análise de vitalidade celular por determinação de percentual de células mortas e vivas. Para tal, foi coletado fragmento de aproximadamente 1 cm do talo liquênico, em sua parte mais jovem, e depositado em placa de vidro, para análise em microscópio. O fragmento de talo foi umedecido com uma gota de água deionizada e macerado, por atrito, entre duas placas de vidro. Ao produto da maceração foi adicionado corante supra vital vermelho neutro a 0,1% (CALVELO; LIBERATORE, 2004; ONJI; SAEABE; EZURA, 2000; REIS, 2013) e as placas foram levadas a microscópio ótico Coleman, modelo N-101B com aumento de 400x. Nas amostras foram contadas 100 células com uma recontagem. Dentre as 100 células observadas foi determinado o percentual de células vivas, coradas pelo vermelho, e células mortas, não coradas (Figura 7).

Figura 8 – Células de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. submetidas ao Vermelho Neutro.



Legenda – A) Célula de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., morta, não corada pelo vermelho neutro; B) Célula viva de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., corada pelo vermelho neutro.

Foto – Iwelton Pereira (2014)

4.3.3.2 Azul de Evans

As amostras expostas e controle foram submetidas à análise de morfologia e vitalidade para determinação de possíveis danos à estrutura morfológica dos indivíduos. Para tal, foram coletados 200 mg de material líquênico, o qual foi cortado à mão livre com tesoura esterilizada e submergido em 10 mL de solução contendo Azul de Evans conforme método de Baker e Mock (1994) alterado por Ikegawa; Yamamoto; Matsumoto (1998). O material ficou submetido à solução de Azul de Evans por 15 minutos e foi posteriormente lavado com cloreto de cálcio (CaCl_2) e observado em lupa para percepção qualitativa dos danos estruturais pela coloração azulada (Figuras 8 e 9).

Para quantificação dos danos estruturais, as amostras foram maceradas em almofariz e diluídas em água deionizada por 12 horas. Transcorrido o tempo de espera, elas foram filtradas e lidas em espectrofotômetro BIOCHORM[®], modelo Libra S22, no comprimento de

onda de 600 nm. Os maiores valores de absorbância obtidos tendem a representar os maiores teores de absorção de Azul de Evans e, portanto, indicam as amostras mais impactadas (BAKER; MOCK, 1994).

Figura 8 – Talo de *Cladonia verticilaris* (Raddi) Fr., controle laboratorial (não exposta ao biodiesel B5), quase sem danos estruturais revelados pelo de azul de Evans.



Foto – Iwelton Pereira (2014)

Figura 9 – Talo de *Cladonia verticilaris* (Raddi) Fr., exposta ao biodiesel B5, com danos estruturais revelados pelo de azul de Evans.



Foto – Iwelton Pereira (2014)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os processos de bioindicação e biomonitoramento já se encontram amplamente consolidados em virtude do incontável número de estudos que demonstram a capacidade que alguns organismos vivos têm de indicar, por meio de alterações fisiológicas, mudanças em seu ambiente (CÁCERES, 1996; KÄFFER et al., 2012; PEREIRA, I., 2011; SANTOS, 2011; SILVA, R., 2002; SILVA, A., et al., 2009).

Durante a revisão de literatura, outrora apresentada, demonstraram-se diversos estudos que lançaram mão de líquens para indicar e/ou monitorar alterações de ordem antrópica no meio. Acrescente-se também, a estas informações, que o processo de transplante de espécies liquênicas já era aplicado desde o fim do século XIX na Europa (SEAWARD, 1993 apud CUNHA et al., 2007)¹³. Cunha et al. (2007) afirmam que o biomonitoramento ativo¹⁴ é um método de monitoramento de poluentes bem mais acessível para áreas de baixo poder aquisitivo. Nessa direção, Guidotti et al. (2003), por exemplo, conseguiram identificar a acumulação progressiva de alguns hidrocarbonetos em espécies de líquens transplantados para áreas da cidade de Rieti, Itália.

Ao longo do tempo, as técnicas para aferir os danos estruturais, morfológicos e fisiológicos causados pelos poluentes à estrutura das diversas espécies estudadas têm se modificado e melhorado no sentido de fornecer respostas mais completas e diagnósticos mais precisos.

A escolha de analisar as amostras seguindo os métodos anteriormente citados se deu pelo entendimento de que, fazendo uso deles, já seria possível detectar ou descartar possíveis danos à estrutura do líquen e que a não utilização de técnicas adicionais não traria nenhum ônus para o estudo.

5.1 Clorofila e feofitina em *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes encontrados nas plantas. Sua denominação foi proposta por Pelletier e Caventou, no ano de 1818, para caracterizar a substância verde que, com o auxílio de álcool, se podia extrair das folhas (STREIT et al.,

¹³ SEAWARD, M. R. D. Lichens and sulphur dioxide air pollution: field studies. **Environ. Rew**, v. 1, p. 73-91, 1993.

¹⁴ Técnica de biomonitoramento que transplanta líquens de áreas tidas como de pouco ou nenhum impacto de poluentes para locais considerados poluídos para determinar, por meio da resposta biológica, índices de degradação no ambiente.

2005). São fundamentais para a realização da fotossíntese, na medida em que respondem pela captação da energia necessária a esse processo (SILVA, H., 2011). Sendo assim, ao se considerar a simbiose alga-fungo (no caso, o líquen), sabe-se que é da alga a responsabilidade de produzir os nutrientes da estrutura, por meio da fotossíntese; daí então quantificar as taxas de produção de clorofila é fundamental para aferir as condições de saúde desses organismos.

Dentre os diversos tipos de clorofilas, os mais comuns são a (a) e a (b), que se encontram, em natureza, geralmente na proporção 3:1, respectivamente (MAIOCCHI; AVANZA, 2004; STREIT et al., 2005). Estas duas clorofilas geralmente aparecem em conjunto com suas formas degradadas: as feofitinas (a) e (b). Principal produto da degradação das clorofilas, a feofitina nada mais é do que uma molécula de clorofila que perdeu o Mg^{2+} (magnésio) e em seu lugar entraram dois átomos de H^+ (hidrogênio), conforme apresentado na Figura 10 (SOARES, 2006).

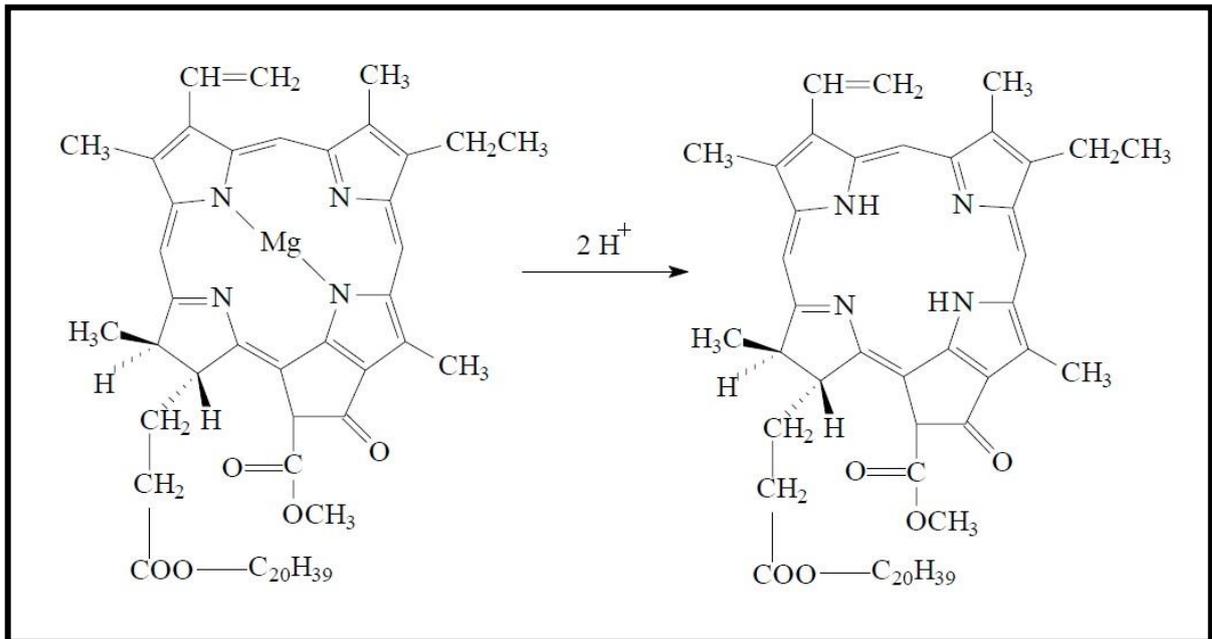
Schoefs (2002) adverte que as clorofilas são pigmentos relativamente instáveis, podendo ser alterados ou destruídos com certa facilidade, dada sua sensibilidade a luz, aquecimento, degradação química etc. Sabe-se ainda, segundo as afirmações de Nifontova (1989 apud SILVA, H., 2011)¹⁵, que, em estruturas líquênicas, na presença de radiação gama, os fotobiontes (fotossintetizantes) sofrem bem mais danos que os micobiontes (fungos).

Assim, entendendo que as alterações no ambiente interferem diretamente na produção de clorofila e feofitina em espécies líquênicas, optou-se na presente perquisição pela quantificação desses pigmentos no grupo Experimental 1, decorridos 30 e 60 dias da exposição¹⁶, e no grupo Experimental 3, decorridos 30 dias da exposição.

¹⁵ NIFONTOVA, M. G., KULIKOV, N. V.; RAVINSKAYA, A. P. Effect of γ -radiation on ^{90}Sr and ^{13}Cs accumulation in lichens. **Ekologia**, v. 6, p. 44-50, 1989.

¹⁶ Entenda-se exposição como o momento único, durante o experimento, em que o material líquênico ficou exposto aos poluentes emanados pelo motor movido a biodiesel B5.

Figura 11 – Esquema da molécula de clorofila (a) sendo degradada a feofitina (a).



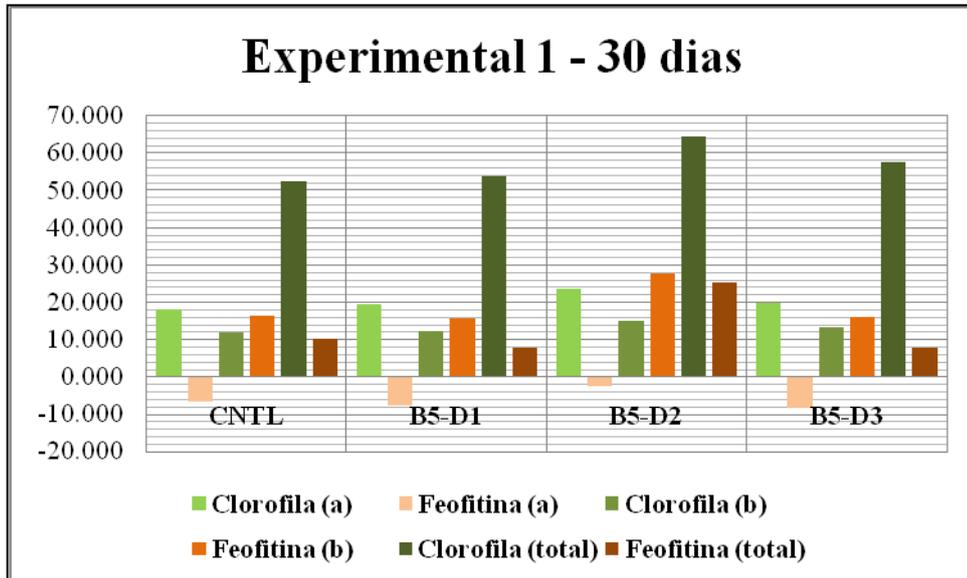
Legenda – a esquerda a molécula de clorofila e a direita, após perder o Mg^{++} e sofrer a adição de dois H^+ , uma molécula de feofitina.

Fonte – SOARES (2006)

Ao observarem-se os dados obtidos para os tempos de 30 e 60 dias pós-exposição do grupo Experimental 1, foi possível perceber uma evolução na resposta biológica dada pela alga depois dos 60 dias. Quando se compara o comportamento das amostras controle com o do material exposto percebe-se que, decorridos 30 dias, a clorofila mantém-se equivalente para todas as amostras, o que poderia indicar vitalidade para todas elas (Figura 11)¹⁷. Contudo, quando se observam os teores desses mesmos compostos decorridos mais 30 dias, pode-se verificar que todos têm decréscimo, à exceção do que é apresentado pelos líquens controle, e há um progressivo aumento nos teores da feofitina (Figura 12).

¹⁷ Entenda-se B5 como a determinação do quantitativo de biodiesel diluído em petrodiesel; D como a indicação da distância a que o material foi exposto; e T como o tempo em que o material ficou submetido aos gases.

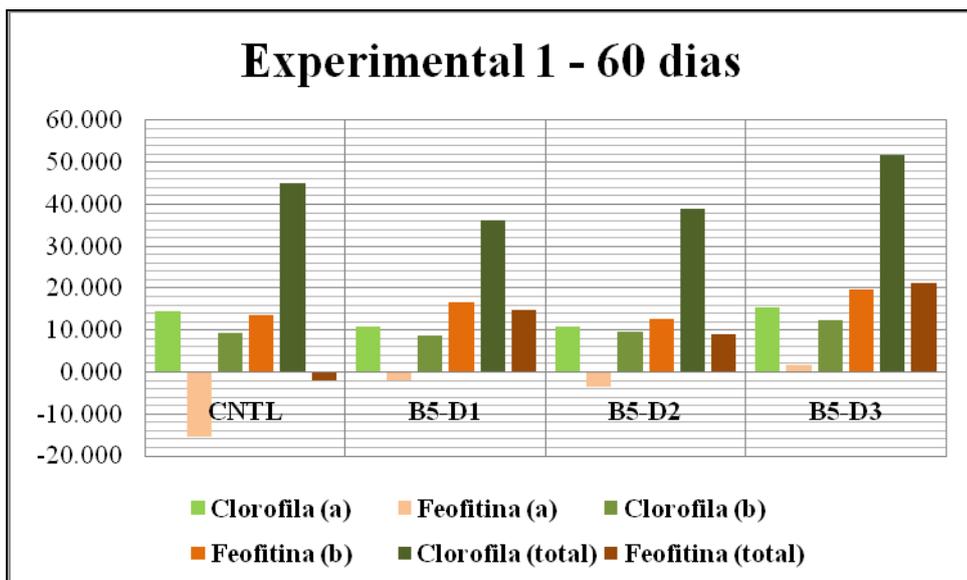
Figura 12 – Gráfico dos teores de clorofila e feofitina, após 30 dias, de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., controle e exposta por 3 minutos aos gases da queima de biodiesel B5, em três distâncias.



Legenda – amostras controle (CNTL), Distância 1 (B5 – D1), Distância 2 (B5 – D2) e Distância 3 (B5 – D3)

Fonte – Iwelton Pereira (2014)

Figura 13 – Gráfico dos teores de clorofila e feofitina, após 60 dias, de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., controle e exposta por 3 minutos à fumaça da queima de biodiesel B5, em três distâncias.



Legenda – amostras controle (CNTL), Distância 1 (B5 – D1), Distância 2 (B5 – D2) e Distância 3 (B5 – D3)

Fonte – Iwelton Pereira (2014)

Essa variação pode ser observada nos gráficos apresentados por Silva, B. (2013), que avaliou a resposta biológica de *C. verticillaris* exposta a policloreto de alumínio e outros coagulantes utilizados no tratamento de água potável. Durante seu estudo, a autora demonstrou que, decorridos os primeiros 30 dias, as produções de clorofila mostraram-se relativamente altas e que, após 60 dias do início do experimento, esses valores caíram para menos da metade, chegando a valores extremamente baixos após 90 dias. Silva, H. (2011) também demonstrou que a mesma espécie, quando submetida à radiação gama, elevou os teores de clorofila após 30 dias e que, nos meses seguintes, tendeu à diminuição, chegando a valores irrisórios. Essa tendência de elevação, num primeiro momento, pode ser explicada como um processo de adaptação e/ou como mecanismo de defesa. A referida autora percebeu aumento em outros compostos liquênicos depois da exposição à radiação e atribuiu essa alteração a mecanismos de defesa da estrutura liquênica.

A variação tardia, como resposta a intempéries, também foi observada por Erbisch (1974)¹⁸, Jones e Platt (1969)¹⁹, Pollum e Erbisch (1972)²⁰, Synder e Platt (1973)²¹, todos citados por Silva, H. (2011). Pawlik-Skowronska e Backor (2011) sugerem a possibilidade de adaptações na estrutura liquênica causarem certa resistência a metais pesados como Pb (chumbo), Zn (zinco) e Cu (cobre), preservando inclusive a estrutura do fotobionte (alga), quando em exposições prolongadas. Entretanto, diferentemente das espécies analisadas por estes autores, o líquen aqui utilizado tem demonstrado em diversos estudos (PEREIRA, I., 2011; SILVA, H., 2011; VASCONCELOS, 2013) que, após 30 dias, os danos estruturais sofridos durante a exposição começam a prejudicar seu metabolismo, comprometendo a produção de pigmentos fotossintéticos.

No grupo Experimental 3, embora se tenha feito apenas uma coleta, decorridos 30 dias, é possível perceber variações consideráveis em relação ao tempo de exposição e da distância entre o material e a fonte emissora de poluição. Diferentemente do que foi observado no grupo Experimental 1, situação em que, após 30 dias, todas as distâncias apresentaram uma produção de clorofila (a) bem semelhante, no grupo Experimental 3

¹⁸ ERBISCH, F. H. Effects of acute and chronic gamma radiation on *Cladonia sylvatica* and *Parmelia sulcata*. **USAEC REPORT COO-2087-7**, Michigan Technological University, 1974.

¹⁹ JONES, J. M.; PLATT, R. B. Effects of ionizing radiation, climate, and nutrition on growth and structure of a lichen, *Parmelia conspersa* (Ach.) Ach. In: SYMPOSIUM ON RADIOECOLOGY, 2., 1969, **USAEC REPORT CONF-670503**, p. 111-119, 1969.

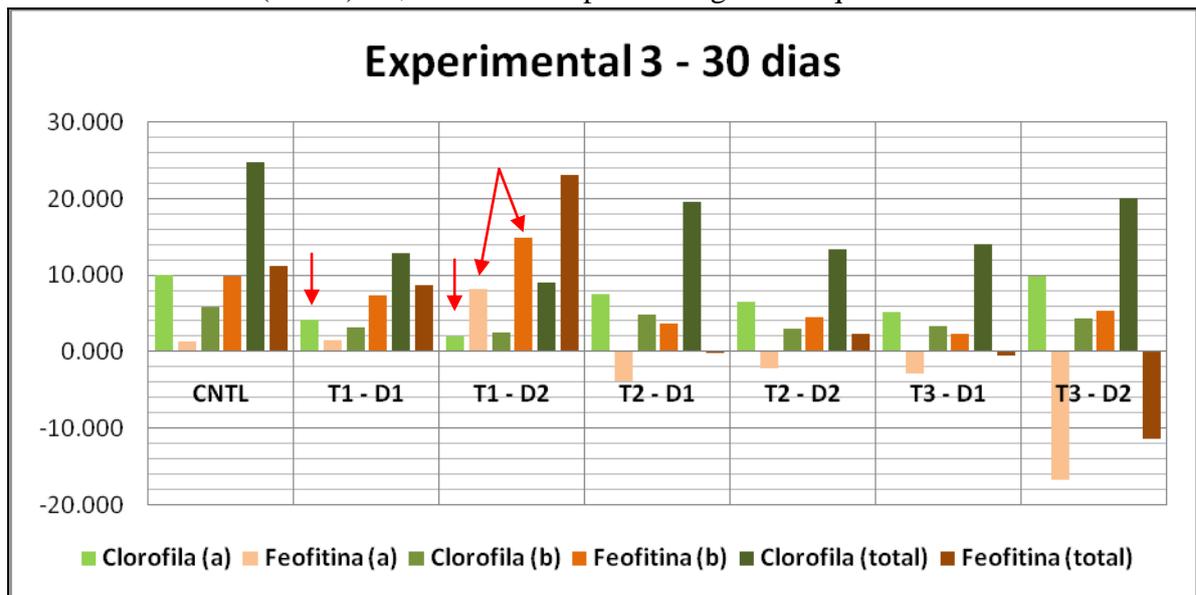
²⁰ POLLUM, P. A., F. ERBISCH, F. H. Effects of gamma radiation on the lichen *Cladonia verticillata* (Hoffm.) Schaer. **Bryologist**, v. 75, p. 48-53, 1972.

²¹ SYNDER, J. M.; PLATT, R. B. The effects of chronic gamma radiation on the growth of a crustose lichen, *Trapelia ornate* (Sommerfelt) Hertel. **Radiation Botany**, v. 13, p. 269-271, 1973.

constata-se diferenças bem marcadas. No Tempo 1 (T1), em suas duas distâncias (D1 e D2), a produção de clorofila mostrou-se inferior a 50% dos pigmentos encontrados nas amostras controle (Figura 14).

Na amostra T1-D2 também é possível perceber um elevado valor das feofitinas (a) e (b), o que deixa claro o impacto sofrido por esta amostra, que ficou exposta por 15 minutos. A Distância 1 deste mesmo tempo (T1-D1), embora apresente valores bem parecidos, indicou maior resistência. Esse fato pode ser atribuído a maior influência da direção dos ventos transportando um maior número de compostos para a amostra que, mesmo estando mais distante, estava diretamente no vetor de dispersão dos gases. Tal explicação confirma a importância da direção dos ventos na dispersão de poluentes, conforme observado por Freitas (2006), Mota Filho (2007) e Pereira, I. (2011).

Figura 14 – Gráfico dos teores de clorofila e feofitina, após 30 dias, de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., controle e exposta aos gases da queima de biodiesel B5



Legenda – apresentam-se no gráfico as amostras controle (CNTL), e as exposições a biodiesel nos três tempos (1 – 15 min; 2 – 30 min; e 3 – 60 min), representados pela letra **T**, e duas distâncias (1 – 1 metro e 2 – 3 metros) representada pela letra **D**.

Fonte – Iwelton Pereira (2014)

Indo, aparentemente, de encontro a esses resultados a amostra T3-D2, submetida ao maior tempo e localizada na distância descrita como insalubre, mostrou a produção mais elevada de clorofilas, dentre os indivíduos expostos. Contudo, Silva, H. (2011), que submeteu amostras da mesma espécie líquênica a diferentes doses de radiação gama, percebeu uma maior produção de clorofilas em algumas doses mais altas quando comparados com doses

menores. O tempo maior de exposição pode ter dado ao líquen mais tempo de adaptação (PAWLIK-SKOWRONSKA; BACKOR, 2011) ou exigido uma hiperprodução desses pigmentos nos primeiros 30 dias, como mecanismo adaptativo (SILVA, H., 2011; SILVA, B., 2013). Esta segunda hipótese parece mais aceitável em face dos resultados obtidos pelo grupo Experimental 1, já apresentado, que demonstrou relativa estabilidade nos primeiros 30 dias e decaimento de quantidades aos 60 dias. Assim, é possível acreditar que caso fosse realizada nova análise deste material após 60 dias já se observaria um decréscimo, talvez maior que nas outras amostras. Destaca-se que o prognóstico apontado tem respaldo nas análises de produção fenólica de T3-D2, apresentadas posteriormente, que indicaram quantidades pequenas dos ácidos liquênicos, em comparação aos resultados das outras amostras.

Streit et al. (2005) referem que o excesso de luminosidade pode inibir a fotossíntese. Isso ocorreria por dois processos: a foto-inibição; e a foto-oxidação, sendo esta irreversível. Nessa direção, Legaz et al. (1986) observaram que amostras de *C. verticillaris* ocorrentes em áreas expostas à luz intensa apresentaram quantidades menores de clorofila, quando comparadas a amostras com crescimento em área sombreada. Diante disso, buscando minimizar a interferência da luz no processo natural de fotossíntese, todas as amostras dos grupos ora estudados, quando em condições laboratoriais, receberam iluminação natural indireta, com o intuito de minimizar a influência de luz extrema nos resultados apresentados.

Streit et al. (2005) ainda dizem que a clorofila (a) é extremamente sensível à degradação oxidativa na presença de ácidos graxos insaturados. O biodiesel, por sua vez, consiste, por definição, em ésteres alquílicos de ácidos graxos, e, nesse sentido, qualquer material não queimado expelido pelo escapamento do motor pode influir na produção e degradação da clorofila (a) presente nas amostras, maximizando a influência negativa dos gases emanados.

Por fim, faz-se necessário apenas mais um esclarecimento acerca dos procedimentos do presente estudo: no grupo Experimental 1, foram realizadas duas coletas para quantificação dos pigmentos liquênicos, por se entender, que, como o referido grupo diz respeito a apenas um tempo de exposição, seria necessário, para fins de comparação, perceber a evolução temporal das amostras, tal como fizeram Pereira, I. (2011), Silva, H. (2011) e Silva, B. (2013); no grupo Experimental 3, por se considerar a diversidade de tempos e de distâncias, optou-se por uma única quantificação de pigmentos, nos primeiros 30 dias, em detrimento das variáveis adicionadas, assim como fizeram Oliveira (2011) e Santos (2011). Estas decisões

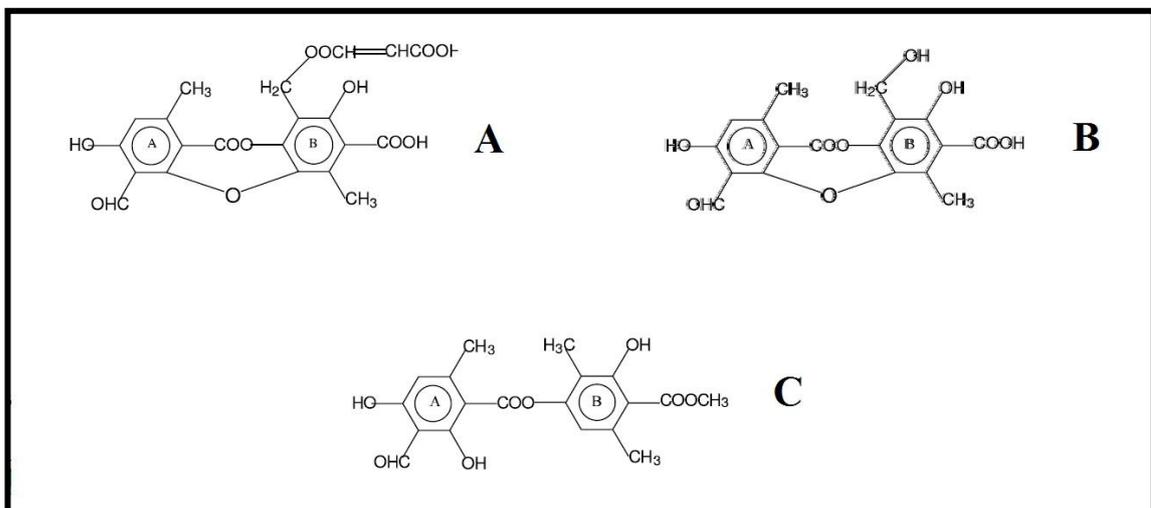
podem ser consideradas acertadas em face dos resultados ora apresentados e dos que ainda estão por vir.

5.2 Fenóis

Os fenóis têm diversos usos comerciais, dentre os quais destacam-se aqueles pertinentes à farmacologia e à agricultura. Falcão et al. (2002) afirmam que desde a antiguidade líquens já são usados como plantas medicinais. Estudos realizados pelos autores demonstraram a ação bactericida de alguns fenóis da espécie *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. Os pesquisadores Ranković e Misić (2008) conseguiram perceber atividade antimicrobiana e antifúngica de ácido fumaprotocetrárico isolado de *Cladonia furcata*. Yano-Melo, Vicente e Xavier Filho (1999) perceberam, por sua vez, que o ácido fumaprotocetrárico estimula de forma significativa o crescimento radicular de *Allium cepa*.

Cada espécie líquênica produz seus próprios fenóis. Ahti; Stenroos; Xavier-Filho (1993) descreveram os ácidos de 22 espécies de líquens da família *Cladoniaceae* coletados nos Estados da Paraíba, de Pernambuco e de Sergipe, no Nordeste brasileiro. Dentre as espécies estudadas estava a *C. verticillaris*, usada aqui como biomonitor, que apresentou como principais ácidos o fumaprotocetrárico (FUM) e o protocetrárico (PRO). Legaz et al. (2006) identificaram ainda a presença de atranorina (ATR). O modelo estrutural dessas três substâncias pode ser observado na Figura 15.

Figura 15 – Modelo estrutural das principais substâncias líquênicas ocorrentes em *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.



Legenda – **A** – Ácido Fumaprotocetrárico; **B** – Ácido Protocetrárico; **C** – Atranorina.

Fonte – Silva (2002)

Pereira, E. et al. (1999) afirmam que a ATR é formada primeiro e, em etapas subsequentes, o PRO é sintetizado, após acoplar-se a uma porção fumarato, origina o FUM. Neste sentido, a produção elevada do PRO e da ATR em detrimento do FUM pode indicar danos que estejam provocando um bloqueio nestas etapas metabólicas. Cientes disso, diversos estudos buscam identificar os níveis de produção do FUM para inferir possíveis alterações na estrutura liquênica por ação de poluentes (CRUZ et al., 2009; CUNHA et al., 2007; MOTA FILHO et al., 2007; PEREIRA, E. et al., 1999).

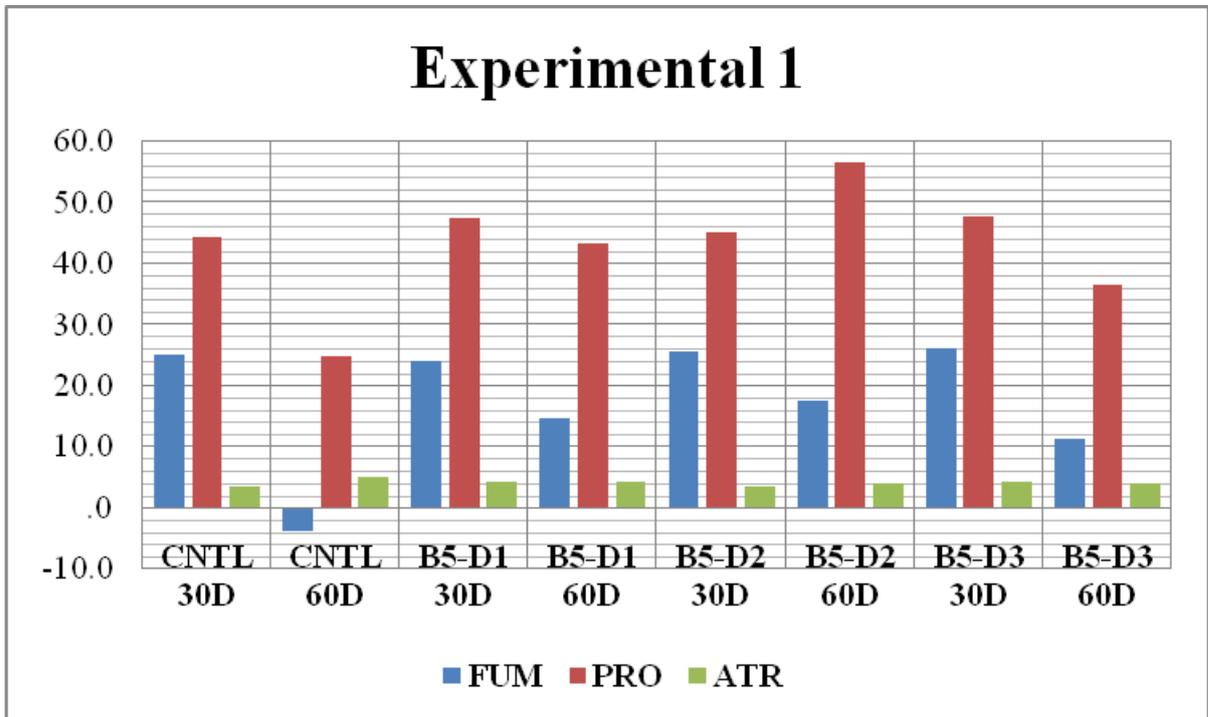
É com este entendimento que se passa a analisar a produção dos ácidos nas amostras expostas à fumaça expelida por motores movidos a biodiesel B5. Contudo, antes é importante destacar que, aqui, trabalhou-se com todos os três grupos (Experimental 1, Experimental 2 e Experimental 3). Tal qual nos resultados de clorofilas e feofitinas, os grupos Experimental 1 e 2 serão analisados por distância da fonte poluidora e tempo de coleta, ao passo que o grupo Experimental 3 será analisado por distância da fonte poluidora e tempo de exposição.

Quando se observa o gráfico resultante das análises fenólicas do grupo Experimental 1 (Figura 16), é possível verificar uma proximidade com o que foi percebido na produção de clorofila da mesma amostra, indicando uma produção equivalente ao grupo controle nos primeiros 30 dias e uma variação nos 30 dias seguintes. Aqui, tal qual nos gráficos de clorofila, é observado um decaimento da produção do FUM, principal ácido desta espécie, em todas as distâncias, com aumento expressivo do PRO na distância 2.

A proximidade anteriormente descrita entre os decaimentos de clorofila e a diminuição na produção do FUM foi destacada e explicada por Silva, R. (2002) como sendo decorrente da diminuição da produção de carboidratos pelo fotobionte, que prejudica o repasse ao micobionte, diminuindo a biossíntese das substâncias liquênicas.

Silva, H. (2011) percebeu perda de capacidade na síntese do FUM, 120 dias decorridos da exposição à radiação UVB, em amostras de *C. verticillaris*. A progressiva diminuição do FUM após determinado tempo, pós-exposição do material, também foi observada por Melo (2011), que expôs *C. salzmannii* à radiação gama e identificou a diminuição com o mesmo tempo decorrido. Silva, B. (2013), ao analisar *C. verticillaris* observou que o tempo de resposta foi de 60 dias após exposição ao policloreto de alumínio. Mota Filho et al. (2007) analisando a mesma espécie, expostas a áreas sob influência do chumbo perceberam o mesmo tempo de reação. Assim, pode-se entender que esse tempo de resposta varia de acordo com o agente causador do estresse e da espécie estudada, demonstrando a eficácia da espécie para o biomonitoramento.

Figura 16 – Gráfico dos teores de FUM, PRO e ATR de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. exposta aos gases da queima de biodiesel B5 durante 3 minutos.



Legenda – Ácido fumaprotocetrário (FUM), ácido protocetrário (PRO) e Atranorina (ATR).
Fonte – Iwelton Pereira (2014)

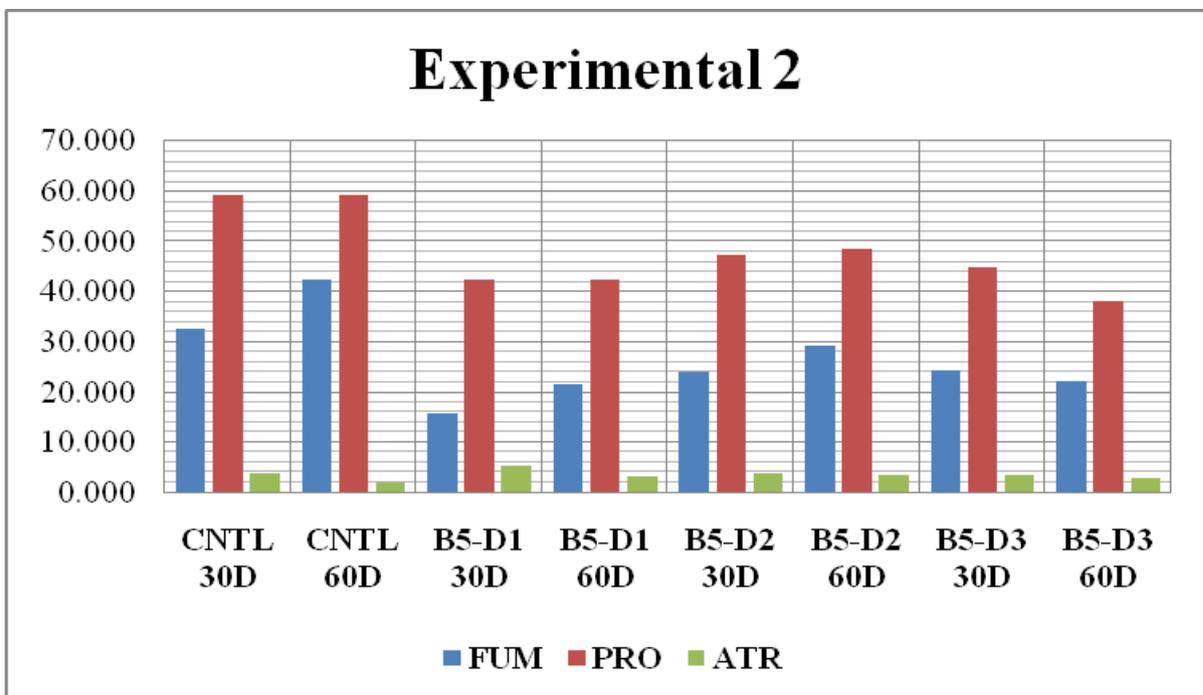
O aumento da produção do PRO na distância 2 depois de 60 dias pode indicar que a amostra tentou metabolizar quantidades consideráveis de FUM, mas foi impedida por algum agente inibidor. Esse processo foi observado por Cunha et al. (2007), que, em seu último mês de coleta, observaram produção elevada de PRO e ATR, não sendo esta muito comum em grandes quantidades para *C. verticillaris*.

O grupo controle comportou-se de forma anômala durante a segunda extração, diminuindo drasticamente os valores de FUM e de PRO e elevando um pouco a quantidade de ATR. Esse tipo de acontecimento é possível em alguns casos. Cunha et al. (2007) observaram que seu ponto controle localizado longe das fontes de poluição demonstrou ser um dos pontos mais críticos. Os autores explicaram tal fato em decorrência de a amostra ter ficado na rota de transporte do calcário extraído. Pereira, I. (2011) percebeu que uma de suas amostras no ponto controle, em área isolada dentro de uma reserva ecológica, apresentou danos severos à capacidade de síntese de fenóis. O autor aventou a possibilidade de esta variação ter ocorrido pela altíssima condição de salubridade e umidade do local, que poderia ter favorecido uma hiper-proliferação da alga e por isso levado à morte do fungo. De toda forma, é sabido que são diversos os fatores que podem interferir na resposta biológica de um indivíduo; por isso,

quando em condições laboratoriais, busca-se neutralizar ao máximo esses fatores, contudo, é sempre possível que algo fuja ao controle.

Observando os resultados do grupo Experimental 2 (Figura 17) é perceptível a disparidade entre as quantidades fenólicas no controle e no material exposto, como foi observado por Mota Filho et al. (2007) após 8 meses de exposição em áreas de extração e beneficiamento do chumbo. Os autores ainda perceberam que, embora o maior foco de exposição fosse a contaminação por chumbo, amostras de *C. verticillaris* que ficaram em locais de intenso fluxo de veículos, bem como de queimadas em ambientes agrícolas, se mostraram mais impactadas, o que possibilita a afirmação de que a resposta aqui apresentada deriva do efeito dos gases emanados pelo combustível utilizado. Destaque-se ainda que, embora as distâncias 1 e 2 também apresentem tendência de elevação no valor do FUM, os quantitativos mais altos, depois de 60 dias, destas duas distâncias, não se igualaram ao quantitativo mais baixo do controle (30 dias). Diga-se também que as amostras controle e D1 demonstraram permanências nos teores de PRO com elevação nos teores de FUM, o que pode indicar uma recuperação da capacidade metabólica.

Figura 17 – Gráfico dos teores de fenóis produzidos por *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., exposta aos gases da queima de biodiesel B5 durante 30 minutos.



Legenda – Ácido fumaprotocetrárico (FUM), ácido protocetrárico (PRO) e Atranorina (ATR).

Fonte – Iwelton Pereira (2014)

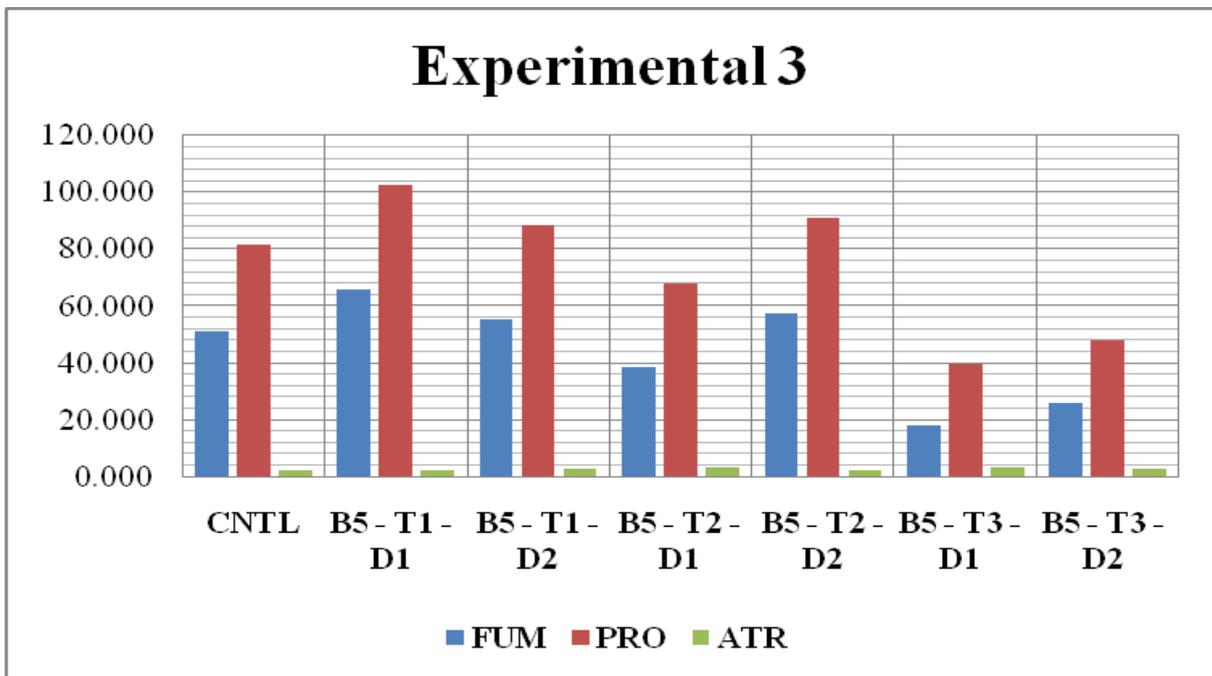
As observações de Silva, H. (2011) sobre *C. verticillaris*, submetida à radiação, destacou elevações consideráveis no quantitativo de FUM depois de 30, 60 e 90 dias, e podem ser contundentes na elucidação de possíveis questões acerca do aumento aqui revelado. A autora atribuiu o aumento a processos adaptativos da amostra, uma vez que foi possível observar, para determinados níveis de radiação, produção maior que as observadas no controle.

Deve-se observar também que, embora todas as amostras se mostrem com tendência a aumento dos metabólitos secundários, a distância 3 foge a esta regra, mostrando um decréscimo do FUM e do PRO, sendo este último mais expressivo. Essa tendência vem corroborar as ideias, já expostas, de que as correntes de vento, mesmo que em pequena escala, atuaram de forma contundente, levando um maior número de poluentes às amostras colocadas nas áreas mais distantes da fonte emissora, indo ao encontro do que foi observado por Mota Filho et al. (2007) e Pereira, I. (2011).

O grupo Experimental 3 guarda uma característica especial em comparação aos outros grupos analisados, pois apresenta uma única coleta e três tempos distintos, o que permite uma análise da resposta imediata em função do tempo ao qual o material foi exposto. Quando observado o gráfico concernente a esse grupo (Figura 18), percebe-se de forma imediata que o mais alto teor fenólico não é da amostra controle (CNTL) e sim da T1-D1, seguida pela T2-D2 e a T1-D2. Esse fato poderia, num primeiro momento, nos levar a afirmar que o líquen no tempo de exposição 1 (15 minutos) não sofreu danos em sua estrutura, uma vez que as duas distâncias apresentam ótimas produções de fenóis, porém, uma análise mais detida, amparada nos dados já apresentados de produção de pigmentos, nos revela que foram exatamente estas amostras (T1-D1 e T1-D2) que apresentaram as menores produções de clorofila, o que indica claramente um descompasso na produção fotossintética. Tal descompasso é corroborado na presença de elevados teores fenólicos, pois Silva, H. (2011) e Silva, B. (2013) observaram que, sob diferentes tipos de estresse, o líquen primeiramente eleva a quantidade de seus fenóis, uma vez que esses quando depositados no córtex funcionam como protetores da estrutura.

As explicações anteriores podem ser aplicadas, sem ônus algum, ao tempo 2, em suas duas distâncias, percebendo-se que os fenóis são produzidos em maior quantidade à distância 2, da mesma forma que pode ser observado o decaimento da clorofila. Como já foi explicado anteriormente, este processo é uma tentativa do organismo de se proteger das intempéries.

Figura 18 – Gráfico dos teores de fenóis produzidos por *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., exposta aos gases da queima de biodiesel B5 durante 15, 30 e 60 minutos.



Legenda – Ácido fumaprotocetrário (FUM), ácido protocetrário (PRO) e Atranorina (ATR).
Fonte – Iwelton Pereira (2014)

Observando os valores referentes ao tempo 3, em sua distância 2, encontram-se resultados contraditórios, pois as amostras apresentam os valores mais baixos de todo o experimento, e, em contrapartida, valores relativamente altos de clorofila. Essa aparente contradição, considerando o exposto até agora, pode ser elucidada a partir dos resultados obtidos por MUNZI et al. (2013). Estes pesquisadores submetem *Evernia prunastri* (L.) Ach., durante 5 semanas, a nitrato de amônio e perceberam que o incremento progressivo de composto – que em outras espécies de líquens e plantas geraria um aumento na acumulação de carbono em sua estrutura para neutralizar o nitrato – foi compensado com um incremento na produção de clorofila (a). Assim, com base nesses resultados, pode-se inferir que, pela exposição aos gases, ricos em dióxido de carbono e outros compostos nocivos, por um período relativamente longo, uma super produção da clorofila (a) tenha sido potencializada. Em conjunto a estas observações, pode-se considerar a possibilidade de os óxidos de enxofre, também presentes nesses gases (MOTA FILHO et al., 2007), terem desencadeado uma reação de degradação tão grande que, mesmo com clorofila em abundância, a síntese dos metabólitos secundários foi comprometida, tal como aventado por Silva, H. (2011). O motivo pelo qual a distância 1 não respondeu de forma idêntica, para clorofila pode ser explicada, mais uma vez,

pela localização em relação a rota de dispersão dos ventos, sendo sua proximidade e tempo de exposição suficiente para interferir na produção de metabólitos secundários sem contudo ser suficiente para gerar uma super produção de algas.

É importante destacar que todos os grupos estudados apresentaram valores extremamente baixos de ATR, o que, segundo Ahti et al. (1993), é extremamente normal para esta espécie, não simbolizando evidência de nenhuma anomalia no metabolismo liquênico.

Ainda sobre os gráficos apresentados, deve-se dizer que todas as amostras demonstraram produções de FUM inferiores ao PRO. Tal fato, observado por Cunha et al. (2007) e por Cruz et al. (2009), está diretamente ligado ao estresse provocado pelo transplante até o laboratório e pela mudança das condições de campo para as laboratoriais.

5.3 Danos estruturais e vitalidade celular

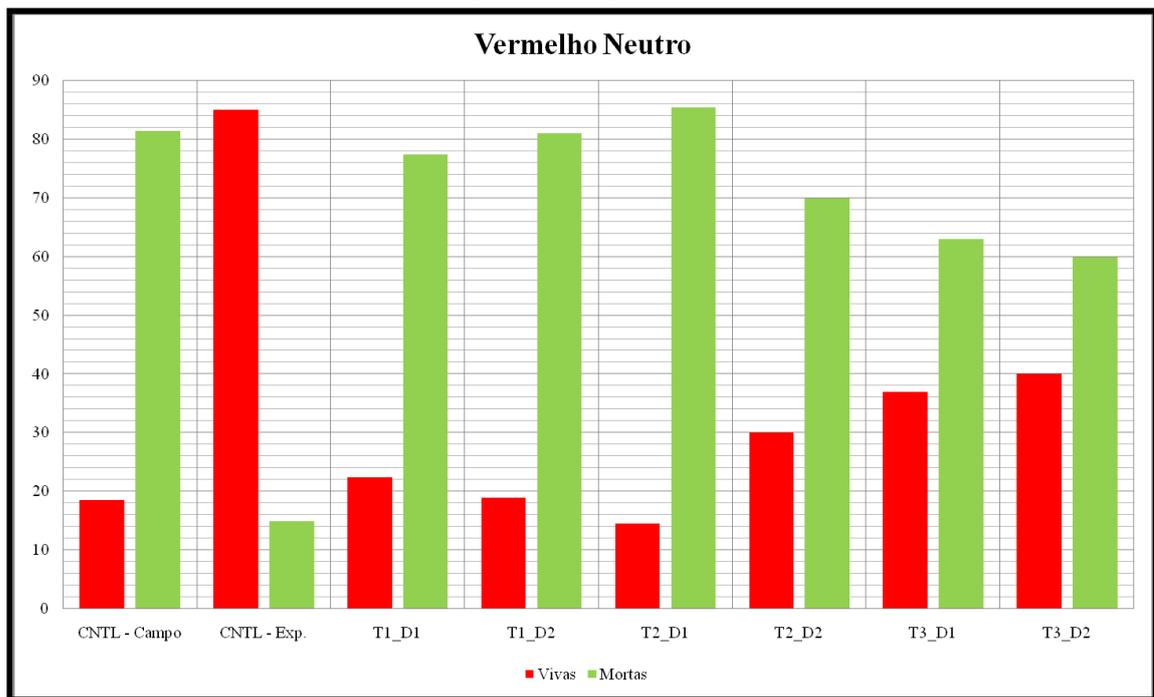
Os processos de avaliação de danos estruturais e de vitalidade celular nas amostras consistem em perceber possíveis danos corticais e medulares causados pelo contato com os poluentes. Dentre as técnicas utilizadas para a verificação dessas condições estão o Vermelho Neutro (ONJI; SAEABE; EZURA, 2000) e o Azul de Evans (IKEGAWA; YAMAMOTO; MATSUMOTO, 1998). A primeira avalia diretamente a taxa de mortalidade das algas, para determinação da vitalidade celular por amostragem, e a segunda avalia os danos causados à estrutura liquênica, permitindo a observação visual das partes mais afetadas e a posterior quantificação, por absorvância, do corante absorvido. Ambas as técnicas consistem em corar as amostras e, a partir destes corantes, determinar estruturas saudáveis ou afetadas dos organismos.

5.3.1 Vermelho Neutro

Para obtenção do percentual de vitalidade celular foram tomadas amostras do talo liquênico (1 cm) que foram cortadas, maceradas, por atrito de placa de vidro, e submetidas ao vermelho neutro, sendo posteriormente analisadas em microscópio ótico. Uma vez no microscópio, foram contadas 100 células, separando-as entre vivas (corada) e mortas (não coradas) como observado por Onji et al. (2000), de forma a obter um percentual ao fim da contagem. Esta contagem foi repetida e uma média foi feita entre os dois procedimentos. Gerando-se assim o gráfico da vitalidade celular (Figura 19).

É importante que se diga que a observação isolada do trabalho de Calvelo e Liberatore (2004) pode gerar dúvidas sobre como se diferenciou as células vivas das mortas, na técnica apresentada. Contudo, a observação dos trabalhos de Onji, Saeabe e Ezura (2000) e Reis (2013) afastam esta dúvida ao deixar claro que o Vermelho Neutro é absorvido apenas por células vivas.

Figura 19 – Gráfico do percentual de células vivas e mortas de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., determinadas pela absorção do corante Vermelho Neutro.



Legenda: Células vivas (em vermelho) e mortas (em verde).

Fonte – Iwelton Pereira (2014)

Apenas o grupo Experimental 3 foi submetido a esta técnica, pois o tempo de acondicionamento em que os outros materiais se encontravam poderia interferir nos resultados obtidos. Essa interferência foi observada no controle de campo que não pode ser submetido, a presente análise, no momento da coleta e por este motivo apresentou taxa de mortalidade de algas superior a 80%. O controle laboratorial, por sua vez, apresentou cerca de 85% de vitalidade das células algais (Figura 19), o que deixa clara a capacidade de recuperação do metabolismo liquênico na ausência de poluentes.

Ao observar os tempos e distâncias apresentados para o vermelho neutro e para os teores de clorofila e feofitina consegue-se perceber claramente as observações feitas por Mazzitelli et al. (2006), que sugeriram uma proximidade entre os resultados de pigmentos e vitalidade celular. A amostra T3 – D1, por exemplo, mostra aqui uma taxa de vitalidade

celular da ordem de 40-60 (%) para células vivas e mortas, respectivamente, o que é melhor quantitativo depois do CNTL-Experimental 3, e na quantificação de pigmentos apresenta a melhor taxa de produção, entre os expostos, equiparando ao controle. No mesmo sentido, a amostra T1 – D2, que aqui apresenta a segunda pior relação de algas vivas e mortas (19-81), demonstrando a pior produção de pigmentos, obtendo valores de feofitina superior aos de clorofila.

Ressalta-se que a morte das algas traz sempre atrelada consigo a morte do fungo, pois este último depende diretamente dos compostos produzidos pelo fotobionte para realização de seu metabolismo. A diminuição da vitalidade celular implica na diminuição da capacidade de metabolizar substâncias.

Lima (2009) observou que, mesmo submetido a meio aquoso por um tempo relativamente grande e em contato com acetato de sódio e caulinita, o líquen *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio apresentou percentuais de 80% de algas vivas em sistemas imobilizados. Assim, os resultados aqui apresentados demonstram o quão impactadas foram algumas das amostras analisadas.

5.3.2 Azul de Evans

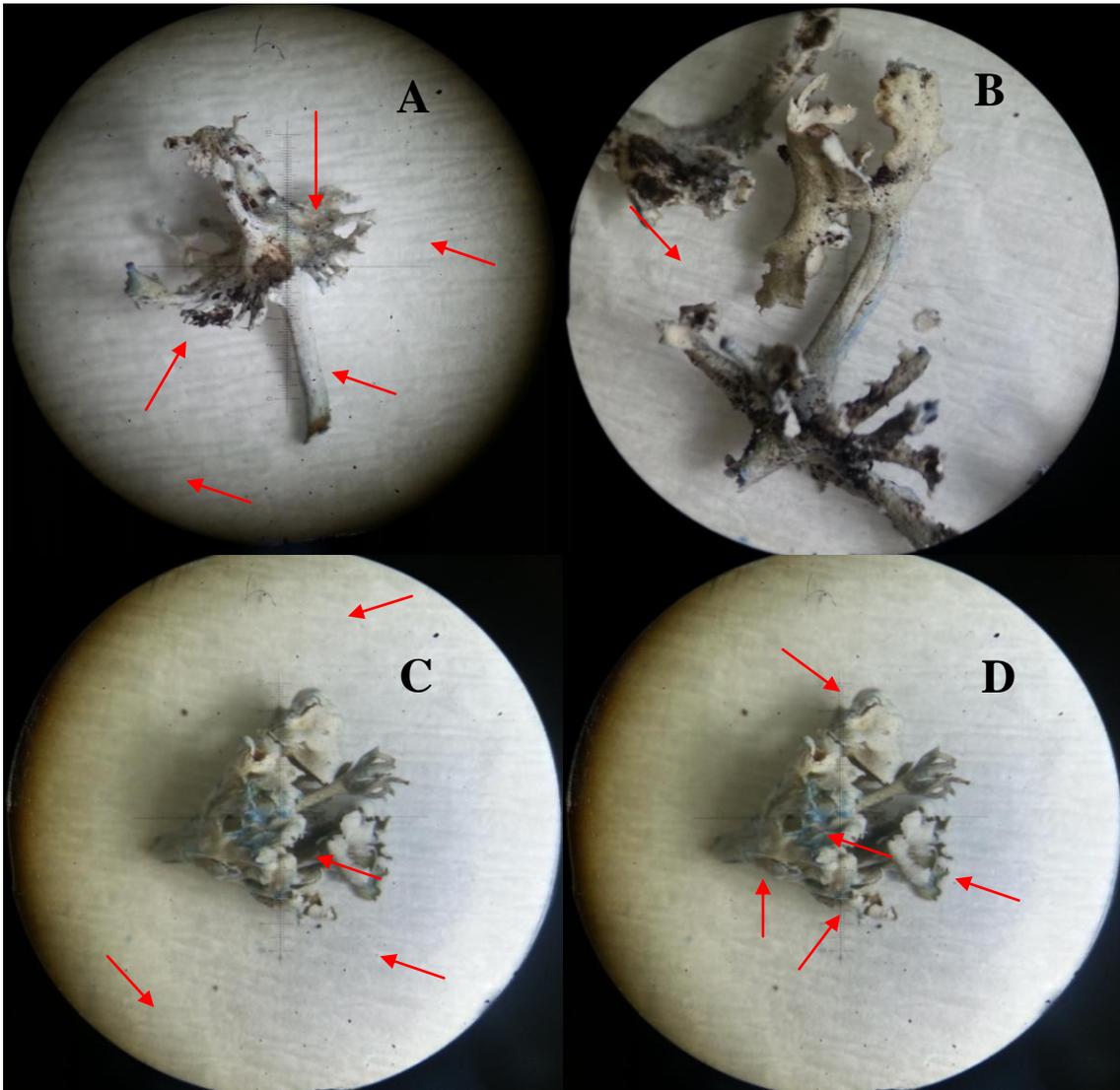
Como recurso para percepção de danos estruturais sofridos pelas amostras liquênicas, submeteu-se o grupo Experimental 3 e o controle de campo a análise por azul de Evans conforme metodologia apresentada por Baker e Mock (1994), com as modificações feitas por Ikegawa; Yamamoto; Matsumoto. (1998).

As amostras submetidas a esta análise, depois de coradas foram observadas em lupa estereoscópica para determinação dos danos morfológicos visíveis. A variação na coloração, observada nas imagens, ocorre pela interação do reagente, de cor azul, com as proteínas do plasma (SILVA, B., 2013).

Assim, quando se observa a resposta dada, após submissão ao azul, percebe-se que o CNTL-Campo (Figura 20 – **A**) demonstrou danos consideráveis a sua estrutura, o que se justifica pelo tempo de acondicionamento, que o mesmo foi submetido. Quando submetida a espectrofotômetro para verificação da absorbância por Azul de Evans, os valores desta amostra mostraram-se bastante altos, confirmando a identificação visual. O CNTL-Experimental 3 (Figura 20 – **B**) por sua vez demonstrou pouquíssimos danos morfológicos, confirmados nos resultados de absorbância (Figura 21). Esta resposta positiva reitera a

hipótese, já apresentada, que o líquen, livre de poluentes e agentes abrasivos, consegue se recuperar de danos causados pelo processo de transplante ao longo do tempo. A amostra T1-D1 (Figura 20 – C) apresentou danos moderados, mais significativos que o CNTL – Experimental 3, porém menos contundentes de que a T2 – D1 (Figura 20 – D).

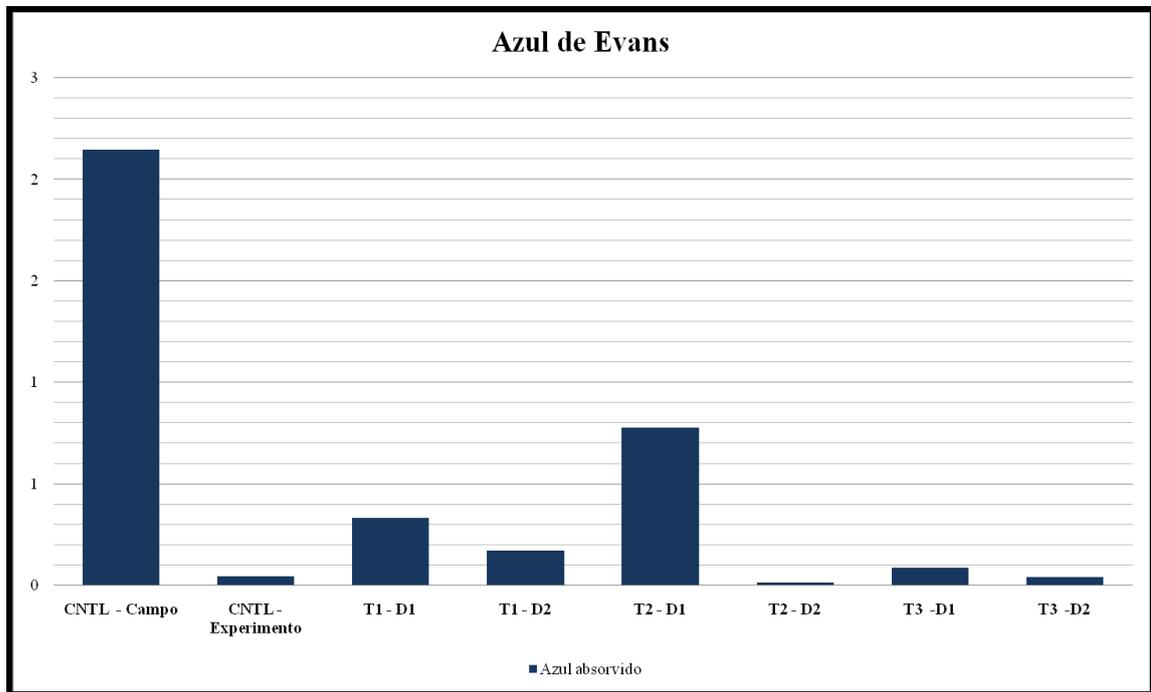
Figura 20 – Imagens do talo de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. exposta a gases emanados pela queima de motor movido a biodiesel B5



Legenda - Danos estruturais destacados pelo azul de Evans. **A** e **B** – Controle-Campo e Controle-Experimental 3, respectivamente. **C** e **D** – Tempo 1 – Distância 1 e Tempo 2 – Distância 1, respectivamente.

Foto – Iwelton Pereira (2014)

Figura 21 – Gráfico da absorbância de Azul de Evans presente em talos de *C. verticillaris* submetida a biodiesel B5 e controles.



Legenda – Quantidade de azul absorvido em cada uma das amostras.

Fonte – O autor

A amostra T2 – D1 se destacou por não ter, durante as análises de produção de pigmentos, demonstrado danos severos a sua estrutura, em comparação com as outras amostras. Contudo, deve-se destacar que já durante a análise de vitalidade celular foi possível perceber uma indicação de desordem fisiologia, pela apresentação do mais alto percentual de células mortas. Essa análise conjunta dos procedimentos utilizados deixa clara a acertada decisão tomada ao fazer uso dos métodos aqui apresentados para verificar as condições fisiologias da espécie estudada.

5.4 Análise integrada

Mesmo na impossibilidade da junção dos gráficos aqui apresentados, dada a construção desvinculada de cada estudo (grupos Experimental 1, Experimental 2 e Experimental 3). É possível tecer alguns comentários de maneira geral sobre tudo o que aqui foi comentado.

Num primeiro momento alguns dados podem até parecer contraditórios, pois interpretações distintas são dadas a respostas biológicas, aparentemente semelhantes. Tais

conclusões só são possíveis pelo entendimento que o todo não é a mera soma das partes, e que uma observação não pode levar em consideração apenas os dados apresentados. Aventar possibilidades e perceber como a interação dos fatores pode gerar respostas inesperadas a perguntas corriqueiras, é, sem dúvida alguma, trabalho do pesquisador.

Quando se observam os dados do grupo Experimental 1 pode-se perceber que não são demonstradas variações marcantes entre suas distâncias. O grupo Experimental 2, por sua vez, demonstra algumas variações em função das distâncias utilizadas. Assim é possível inferir que o líquen responde bem a variações no tempo de exposição e demonstra diferença na resposta às distâncias a partir de determinado tempo de exposição.

Foi considerando esses fatores que se decidiu pela variação do tempo e da distância durante a exposição do grupo Experimental 3. Tal escolha gerou resultados consistentes e demonstraram que tempos intermediários podem ser extremamente danosos à produção dos pigmentos líquênicos (T1 – D1 e D2), enquanto que tempos maiores podem ser mais nocivos para a síntese dos metabólitos secundários, podendo potencializar a produção de metabólitos intermediários (T3 – D2).

Dentre os compostos do biodiesel B5, que podem estar atuando como agentes de degradação da estrutura líquênica pode estar o SO₂, um dos produtos da queima do diesel (MOTA FILHO et al., 2007), que, segundo Richardson e Pucket (1973 apud CÁCERES, 1996)²² pode causar o aumento de íons livres de Mg²⁺ e compostos de enxofre em folhas de plantas, causando uma elevação no nível de feofitina. Como as algas são seres fotossintetizantes, tal qual as plantas superiores, e as estruturas líquênicas são boas acumuladoras de poluentes (BAČKOR et al., 2009; GUIDOTTI et al, 2003; MUNZI et al., 2013; PAWLIK-SKOWROŃSKA; BAČKOR, 2011), é possível que as alterações aqui descritas, nos níveis de clorofila e, por conseguinte, na metabolização dos fenóis, seja causada pela presença desse poluente.

Sobre a presença de SO₂ no biodiesel, é importante dizer que o mesmo é virtualmente livre, quando a 100% (POMPELLI et al., 2011; RAMOS et al., 2003), mostrando uma redução de até 98% desses composto, em relação ao petrodiesel. Contudo, a diluição de 5% do diesel de origem biológica ainda se mostrou incipiente, amparando-se nos resultados desta perquisição.

²² RICHARDSON, D. H. S.; PUCKETT, K. J. Sulphur dioxide and photosynthesis in lichens. In: FERRY, B. W.; BADDELEY, M. S.; HAWKSWORTH, D. L. **Air Pollution and Lichens**, London: The Athlone Press, 1973. p. 283-298.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a desenvoltura dos dados apresentados é possível entender que a diluição de biodiesel (5%) em petrodiesel utilizada neste estudo se mostrou impactante à estrutura do líquen *C. verticillaris* em todos os tempos de exposição e distâncias do emitente, sendo mais contundente a distâncias de 2 e 3 metros e após 15 minutos de exposição. Esta afirmação é possível pela observação dos resultados de produção de pigmentos (clorofila e feofitina), que variaram em função do tempo exposto, demonstrando diminuições significativas, para tempos intermediários, depois de 30 dias. Indo também nessa direção os resultados obtidos pelas análises de vitalidade celular e danos estruturais, para o grupo Experimental 3, acabaram ratificando as análises de pigmentos, subsidiando, por sua vez, a interpretação da produção fenólica.

Como justificativa para os resultados apresentados pode-se indicar à emanção de poluentes como dióxidos de carbono e enxofre (CO_2 e SO_2). É sabido que as produções destes compostos, em diesel de origem biológica, são bem baixas, contudo, sua pequena concentração, diluída em diesel de petróleo, pode não ter surtido um efeito significativo.

Neste contexto, as observações poderiam ser comprovadas com o desenvolvimento de novos estudos que exponham a mesma espécie líquênica a concentrações crescentes de biodiesel, chegando ao ideal de 100%, e realizando-se as análises aqui apresentadas. Com a determinação progressiva da resposta líquênica às várias concentrações desse combustível será possível atestar seu caráter menos poluente como afirmaram Pompelli et al. (2011) e Ramos et al. (2003).

Também sugere-se a aplicação de técnicas adicionais, a exemplo da quantificação dos hidrocarbonetos acumulados na estrutura do líquen, como fizeram Guidotti et al. (2003), e da análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como fez Silva, B. (2013).

REFERÊNCIAS

- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER FILHO, L. The lichen family *Cladoniaceae* in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brazil. **Tropical Bryology**. v. 7, p. 55-70, 1993.
- ARAÚJO, E. L. et al. Quantificação dos teores de clorofila e feofitina de *Parmotrema praesorediosum* no campos da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil. In: ENCUESTRO DEL GRUPO DE LIQUENÓLOGOS DE AMÉRICA LATINA, IX, 2009, Corrientes, **Anais...** Corrientes: 2009. p. 23
- BAČKOR, M. Physiological adaptation in the lichens *Peltigera refescens* and *Cladina arbuscula* ver. Mitis, and moss *Racomitrium lanuginosum* to copper-rich substrate. **Chemosphere**, v. 76, p. 1340-1343, 2009.
- BAKER, C. J.; MOCK, N. M. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, p. 7-12, 1994.
- BICUDO, F. Os bons companheiros. **Pesquisa FAPESP**, v. 173, p. 52-55, 2010.
- BRASIL, Ministério de Minas e Energia. **Plano nacional de energia 2030**. Brasília, DF: MME, EPE, 2007. 324 p.
- BUTTERBACH-BAHL, K.; KIESE, R. Bioenergy: biofuel production on the margins. **Nature**, v. 493, p. 483-485, 2013.
- CÁCERES, M. E. S. **Biomonitoramento ativo e passivo da qualidade do ar atmosférico na cidade do Recife-PE**. 1996. 77 f. Monografia (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.
- CALVELO, S.; LIBERATORE, S. Applicability of in situ or transplanted lichens for assessment of atmospheric pollution in Patagonia, Argentina. **Journal of Atmospheric Chemistry**, v. 49, p. 199-210, 2004.
- CORRÊA, R. L. **Trajetórias geográficas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2005. 302 p.
- COX, C. B.; MOORE, P. D. **Biogeografia: uma abordagem ecológica e evolucionária**. Tradução Luís Felipe Coutinho Ferreira da Silva. Rio de Janeiro: LTC, 2009.
- CPRM – Serviço Geológico do Brasil. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Alhandra, Estado da Paraíba**. Recife: CPRM/PRODEEM, 2005. 10 p.
- CRUZ, M. B. et al. Monitoramento da ação do formaldeído sobre *Cladia aggregata* (líquen), em condições de laboratório. **Caminhos da Geografia**, v. 10, n. 29, p. 76-87, 2009.
- CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thinlayer-chromatographic method. **Journal of Chromatography**, v. 72, p. 113-125, 1972.

- CUNHA, M. H. A. et al. *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., para diagnóstico da salubridade do ar decorrente da extração e beneficiamento de calcário em Vertente do Lério, Pernambuco (Brasil). **Caminhos da Geografia**, v. 8, n. 22, p. 49-65, 2007.
- CZEPAK, C.; ARAÚJO, E. A.; FERNANDES, P. M. Ocorrência de cupins de montículo em pastagem no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, n. 1, p. 35-38, 2003.
- DABDOUB, M. J.; BROZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, p. 776-792, 2009.
- FALCÃO, E. P. S. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos de líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2002.
- FREITAS, M. R. **Uso de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. (líquen) como biomonitor da qualidade do ar no complexo industrial portuário de Suape – PE**. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- GODOI, J. M. A.; OLIVEIRA JUNIOR, S.; MATAI, P. H. Dimensões geopolíticas e ambientais dos biocombustíveis no Brasil. **Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 7, n. 1, p. 34-51, 2012.
- GUIDOTTI, M. et al. Lichens as polycyclic bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. **Journal of Chromatography**, v. 985, p. 185-190, 2003.
- IKEGAWA, H.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Cell death caused by a contamination of aluminum and iron in cultured tobacco. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 474-478, 1998.
- KÄFFER, M. I. et al. Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. **Environmental Pollution**. v. 163, p. 24-31, 2012.
- KNAPP, M. B. **Análise de emissões de Gases em Motor diesel comparando diesel com biodiesel**. 2010. 25f. Monografia (Trabalho de conclusão do Curso de Engenharia Mecânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- KNOTHE, G. et al. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Editora Blucher, 2006. 340 p.
- LEGAZ, M. E.; MILLANES, A. M.; CÓRDOBA, C. V. Fisiologia de líquens. In: XAVIER-FILHO, L. et al. **Biologia de líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. p. 147-273.
- LEIRAS, A.; HAMACHER, S.; SCAVARDA, L. F. Análise da viabilidade econômica da cadeia produtiva do biodiesel: o caso da soja na Bahia. **Revista Gestão Industrial**, v. 3, n. 4, p. 121-133, 2007.
- LIMA, C. R. V. **Produção de metabolitos bioativos de *Pseudocyphellaria aurata* (Anc.) Vainio por imobilização de fragmento do talo**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- MAIOCCHI, M. G.; AVANZA, J. R. Degradación de clorofilas y feofitinas a diferentes temperaturas em *Ilex dumosa* e *Ilex paraguariensis*. In: COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

Y TECNOLÓGICAS 2004, Corrientes. **Resumen...** Corrientes: Universidad Nacional Del Nordeste, 2004.

MARCELLI, M. P. Fungos liquenizados. In: XAVIER-FILHO, L. et al. **Biologia de liquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. p. 25-74.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 51, n. 2, p. 60-79, 2008.

MAZZITELLI, S. M. A. M. et al. Utilização de liquens no biomonitoramento da qualidade do ar. In: XAVIER-FILHO, L. et al. **Biologia de liquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. p. 101-143.

MELO, P. **Radiação gama na funcionalidade e Interação de *Cladonia salzmannii* nyl. (líquen) com o solo**. 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

MOTA FILHO, F. O. et al. Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. como biomonitor. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1072-1076, 2007.

MOTA FILHO, F. O. et al. **Líquens: Bioindicadores ou Biomonitoradores?** 2005. Disponível em: < http://biomonitor.ist.utl.pt/biomonitor/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=9>. Acesso em: 28 dez. 2013.

MUNZI, S. et al. Effect of nitrogen supply on the C/N balance in the lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, p. 165-170, 2013.

NASCIMENTO, F. R.; SAMPAIO, J. L. F. Geografia física, geossistemas e estudos integrados da paisagem. **Revista da Casa da Geografia de Sobral**, v. 6/7, n. 1, p. 167-179, 2004/2005.

NASH III, T. H. Lichen sensitivity to air pollution. In: NASH III, T. H. **Lichen Biology**. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2008. p. 299-314.

OLIVEIRA, M. A. G. S. **Avaliação da qualidade do ar em ambiente industrial, usando líquen como biomonitor de possíveis riscos de intoxicação ocupacional**. 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

ONJI, M.; SAEABE, T.; EZURA, Y. An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton. **Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.**, v. 51, n. 3, p. 153-157, 2000.

PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; BACKOR, M. Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatin than specimens living in unpolluted habitats. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, p. 64–70, 2011.

PEREIRA, E. C. et al. Production of lichen by immobilized cells of *Cladonia clathrata* Ahti & Xavier Filho. **Phyton**, v. 39, n. 1, p. 79-89, 1999.

- PEREIRA, E. C. **Produção de metabólicos por espécies de *Cladoniaceae* (líquen) a partir de imobilização celular**. 1998. 240 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1998.
- PEREIRA, I. M. C. **Biomonitoramento ativo em áreas de Pernambuco: uma perspectiva da influência da cana e de outras fontes poluidoras**. 2011. 42 f. Monografia (Geografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- PEREIRA, V. H. C.; CESTARO, L. A. A unidade geoambiental tabuleiro costeiro e o planejamento municipal: o caso de Senador Georgino Avelino/RN. **Revista Geonorte**, v. 3, n. 4, p. 390-401, 2012. Edição especial.
- POMPELLI, M. F. et al. Crise energética mundial e o papel do Brasil na problemática de biocombustíveis. **Agronomia Colombiana**, v. 29, n. 2, p. 361-371, 2011.
- POMPELLI, M. F. et al. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in acetone, ethanol and dimethylsulphoxide. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, p. 52-58, 2013.
- RAMOS, L. P. et al. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.
- RANKOVIĆ, B.; MIŠIĆ, M. The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*. **Biotechnol & Biotechnol**, EQ 22, p. 1013-1016, 2008.
- REIS, M. V. P. **Avaliação de diferentes meios de armazenagem para dentes avulsionados: estudo Experimental 3 em cães**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
- RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. Tradução Pedro P. de Lima-e-Silva. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 546 p.
- ROSS, J. L. S. (Org.). **Geografia do Brasil**. São Paulo: Edusp, 2009. 549 p.
- SANTOS, T. O. **Biomonitoração da qualidade do ar em decorrência da queima da cana-de-açúcar na reserva ecológica de Gurjaú-PE**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- SARTORI, M. A. et al. Análise de arranjos para extração de óleos vegetais e suprimentos de usina de biodiesel. **RESR**, v. 47, n. 2, p. 419-434, 2009.
- SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of pigments and methods of analysis. **Trends in Foods Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.
- SILVA, A. K. O. et al. Avaliação do Índice de Pureza Atmosférica (IPA) no campos da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil. In: ENCUESTRO DEL GRUPO DE

LIQUENÓLOGOS DE AMÉRICA LATINA, IX, 2009, Corrientes, **Anais...** Corrientes: 2009. p. 58.

SILVA, A. K. O. et al. Avaliação do Índice de Pureza Atmosférica (IPA) e da Densidade Arbórea (DA) no Parque da Jaqueira – Recife-PE. In: ENCONTRO DO GRUPO BRASILEIRO DE LIQUENÓLOGOS, 5., 2010, Recife, **Anais...** Recife: 2010a. 1 CD-ROM.

SILVA, A. K. O. et al. Quantificação de Clorofila e feofitina de *Parmotrema praesorediosum* no Parque da Jaqueira – Recife-PE. In: ENCONTRO DO GRUPO BRASILEIRO DE LIQUENÓLOGOS, 5., 2010, Recife, **Anais...** Recife: 2010b. 1 CD-ROM.

SILVA, B. C. G. **Efeitos de contaminantes sobre *Cladonia verticillaris***. 2013. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Geográficas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA, H. P. B. **Efeitos da radiação gama e ultravioleta sobre *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. (líquen) coletado em diferentes ambientes do nordeste do Brasil**. 2011. 69f. Tese (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SILVA, R. A. ***Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor padrão da qualidade do ar no Distrito de Jaboatão – PE**. 2002. 148 f. Dissertação (Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

SOARES, R. R. S. **Estudo de propriedades da Clorofila *a* e da Feofitina *a* visando a Terapia Fotodinâmica**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

VASCONCELOS, T. L. **Influência do fósforo na produção de substâncias transformadoras do solo sob *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr**. 2009. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

VERNON, L. P. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. **Anal. Chem.**, v. 32, p. 1144-1150, 1960.

VILLAROUCO, F. M. O. et al. Análise do líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., em condições laboratoriais sob efeito do estireno e ciclohexano. **Interciência**, v. 32, n. 4, p. 242-246, 2007.

YANO-MELO, C. C.; VICENTE, C.; XAVIER-FILHO, L. Allelopathic effects of the *Cladonia verticillaris* lichen extracts and fumarprotocetraric acid on the early growth of germinated seedlings in *Allium cepa* L. **Tropical Bryologist**, v. 17, p. 133-139, 1999.