MARIA ALICE GONÇALVES DA SILVA OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO AR EM AMBIENTE INDUSTRIAL, USANDO LÍQUEN COMO BIOMONITOR DE POSSÍVEIS RISCOS DE INTOXICAÇÃO OCUPACIONAL

RECIFE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DA PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOGRAFIA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO AR EM AMBIENTE INDUSTRIAL, USANDO LÍQUEN COMO BIOMONITOR DE POSSÍVEIS RISCOS DE INTOXICAÇÃO OCUPACIONAL

MARIA ALICE GONÇALVES DA SILVA OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geografia, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Geografia.

Orientadora
Profª. Drª. Eugênia Cristina Pereira

Co-Orientador
Profº. Drº. Nicácio Henrique da Silva

RECIFE

2011

Catalogação na fonte
Bibliotecária Divonete Tenório Ferraz Gominho, CRB4-985

O48a Oliveira, Maria Alice Gonçalves da Silva
Avaliação da qualidade do ar em ambiente industrial, usando líquen como biomonitor de possíveis riscos de intoxicação ocupacional / Maria Alice Gonçalves da Silva Oliveira. – Recife: O autor, 2011.
64 p. : il., 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Eugênia Cristina Pereira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco CFCH. Programa de Pós-Graduação em Geografia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Geografia. 1. Contaminação do ambiente. 2. Contaminação industrial. 3. Ácido fumarprotocetrárico. I. (Orientadora). Pereira, Eugênia Cristina. II. Titulo.

910 CDD (22.ed.) UFPE (CFCH) 2011-09

FICHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora

Orientadora:

Profª. Drª. Eugênia Cristina Pereira

(Universidade Federal de Pernambuco)

Examinadores:

Prof. Dr. Fernando de Oliveira Mota Filho

(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof. Dr. Ranyere Silva Nóbrega

(Universidade Federal de Pernambuco)

Data da aprovação 18/02/2011

Aos meus queridos pais exemplos de

honestidade, dignidade e amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar durante a minha caminhada.

Aos meus pais, minha irmã e Del, por acreditarem em mim sempre, e me darem toda força necessária para chegar até o fim.

Ao Programa de Pós-graduação em Geografia da Universidade Federal de Pernambuco, onde realizei o mestrado.

Ao Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica pela oportunidade de realização dos meus experimentos.

À professora Eugênia minha orientadora, e ao professor Nicácio Henrique meu co-orientador.

Aos meus colegas do Laboratório de Produtos Naturais e do Departamento de Ciências Geográficas

Ao técnico de laboratório João Virgínio do Departamento de Bioquímica, por toda sua ajuda.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE pelo auxílio financeiro concedido durante o mestrado.

LISTA DE FIGURAS **PÁGINA**

Figura 01: Estrutura do talo liquênico **20**

Figura 02: *Cladonia verticillaris* em ambiente natural – Saloá-PE **28**

Figura 03: Localização da área de coleta de liquens e solo, Saloá-PE **29**

Figura 04: Planta da indústria com localização dos 12 pontos com experimentos **30**

Figura 05: Ponto 07-pavimento superior da coagulação 2800 **31**

Figura 06: Ponto 08- Bomba de estireno **31**

Figura 07: Ponto 09-Base da esfera de armazenamento do estireno **32**

Figura 08: Ponto 10- Área vegetada utilizada para lazer (próximo à oficina COMAL - 2800) **32**

Figura 09: Ponto 11- Área vegetada com viveiro de passarinhos utilizada para lazer **32**

Figura 10: Ponto 12- Área de armazenamento da pirrolidina (área 2300) **32**

Figura 11: Montagem do experimento com C. verticillaris em laboratório **33**

Figura 12: Experimento sendo borrifado com água ou contaminante **33**

Figura 13: Extração dos fenóis corticais e medulares de *Cladonia verticillaris* **34**

Figura 14: Câmara de luz **35**

Figura 15: Chapa aquecedora das placas cromatográficas **35**

Figura 16: Cromatógrafo líquido **35**

Figura 17: Espectrofotômetro **36**

Figura 18: Lupa estereoscópica **37**

Figura 19: Cromatografia liquida de alta eficiência do padrão (FUM) - **a** e de *Cladonia verticillaris* tempo zero - **b**. **40**

Figura 20: Cromatografia liquida de alta eficiência de *Cladonia verticillaris* após um mês de exposição ao ambiente industrial. **41**

Figura 21: Cromatografia liquida de alta eficiência de *Cladonia verticillaris* após oito meses de exposição em diferentes pontos de ambiente industrial. **45**

Figura 22: CCD fenóis totais do material após oito meses de exposição ao ambiente industrial. **46**

Figura 23: Cromatogramas de extratos de fenóis corticais de *Cladonia verticillaris* submetida ao estireno em condições laboratoriais **48**

Figura 24: Cromatogramas de extratos de fenóis medulares de *Cladonia verticillaris* submetida ao estireno em condições laboratoriais **49**

Figura 25: Cromatogramas de extratos de fenóis corticais de *Cladonia verticillaris* submetida à pirrolidina em condições laboratoriais **50**

Figura 26: Cromatogramas de extratos de fenóis medulares de *Cladonia verticillaris* submetida à pirrolidina em condições laboratoriais **51**

Figura 27: Imagem em lupa estereoscópica de *Cladonia verticillaris* após um mês de exposição, sob condições laboratoriais **52**

Figura 28: Teor de clorofilas e feofitinas de *Cladonia verticillaris* tempo zero(TZ), após um mês de submissão à água deionizada(Cont), estireno(Est) e pirrolidina(Pir). **54**

SUMÁRIO **PÁGINA**

AGRADECIMENTOS **5**

LISTA DE FIGURAS **6**

RESUMO **10**

ABSTRACT **11**

1. INTRODUÇÃO **12**

2. REVISÃO DA LITERATURA **17**

2.1. Intoxicação ocupacional **18**

2.2. Líquen e seu funcionamento **20**

2.3. Líquen como biomonitor **21**

3. MATERIAIS E MÉTODOS **27**

3.1. Coleta e armazenamento do material liquênico **28**

3.2. Avaliação do material exposto ao ambiente industrial **30**

3.3. Ensaios sob condições laboratoriais **33**

3.4. Análise morfológica e química do material teste **34**

3.4.1. Obtenção dos extratos orgânicos - fenóis corticais e medulares **34**

3.4.2. Cromatografia em camada delgada (CCD) **34**

3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) **35**

3.4.4. Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos **36**

3.4.5. Avaliação morfológica de amostras submetidas a contaminantes **36**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **38**

4.1. Análise do material exposto ao ambiente industrial **39**

4.2. Análise do material submetido ao estireno e à pirrolidina em laboratório **47**

5. CONCLUSÕES **55**

6. . REFERÊNCIAS **58**

RESUMO

Estudos realizados com liquens da região Nordeste destacam *Cladonia verticillaris* como biomonitor da qualidade do ar em áreas urbanas e industriais. Objetivando-se avaliar o risco de contaminação ocupacional numa indústria petroquímica no Estado de Pernambuco, utilizou-se *C. vetrticillaris* em ensaios de biomonitoramento. Após oito meses de exposição ao ambiente industrial em 12 pontos monitorados, *C. verticillaris* apresentou comportamento diferenciado em 6, portanto, esse material foi selecionado para realização de testes complementares de cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD) após 1 e 8 meses de experimento. Nas CLAEs realizadas no material após um mês de experimento foram constatados teores do principal composto produzido pela espécie (ácido fumarprotocetrárico - FUM) próximos ao do material tempo zero (0,8 mg/mg). Após 8 meses de experimento o FUM foi detectado nos ensaios de CCD e CLAE nos pontos 07, 08 e 10. O ponto 09 e o 11 apresentaram apenas bandas referentes ao PRO na CCD, na CLAE foram obtidos picos com tempo de retenção semelhantes ao do PRO. O FUM não foi detectado em nenhum dos ensaios referente ao ponto 12. Foram realizados também ensaios em laboratório onde o material foi submetido a estireno ou pirrolidina (produtos processados na indústria) com objetivo de verificar a ação isolada desses produtos. O material foi coletado periodicamente para realização de ensaios de CCD, visualização em lupa e quantificação de pigmentos (clorofilas e feofitinas). A partir da análise das CCDs constatou-se a presença de bandas referentes ao FUM e ao PRO no material submetido ao estireno. No experimento com pirrolidina houve a ausência de bandas referentes aos compostos produzidos pela espécie, demonstrando que o material foi mais sensível á pirrolidina do que ao estireno. A partir da quantificação de pigmentos observou-se diminuição da produção de clorofilas e feofitinas no material submetido ao estireno, além do nível de feofitina ultrapassar o de clorofila. No material submetido á pirrolidina ocorreu uma produção exacerbada de feofitina (15,6 mg/mL). Tais resultados foram ratificados através da visualização do material em lupa onde constatou-se maiores alterações quanto a coloração no material submetido à pirrolidina que passou para a cor marrom, refletindo alta concentração de feofitina. Os resultados das análises do material submetido ao ambiente industrial a aos contaminantes em laboratório se ratificam e indicam o ponto 12 como de maior risco de contaminação ocupacional devido à pirrolidina.

Palavras chave: *Cladonia verticillaris*, biomonitor, contaminação ocupacional e ácido fumarprotocetrárico.

ABSTRACT

Studies with lichen from the Northeastern region highlight *C. verticillaris* as a biomonitor of air quality in urban and industrial areas. Aiming to evaluate the occupational risk of contamination in a petrochemical industry in Pernambuco State, *C. verticillaris* was used in biomonitoring tests. After eight months of exposure to industrial environment in 12 locations monitored, the lichen responded differently to 6 of them, so this material was selected for further testing of high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC) after 1 and 8 months of experiment. In HPLC testing, after 1 month of the experiment, levels of the main compound produced by the species (fumarprotocetraric acid - FUM) were recorded close to the one of zero time material (0.8 mg/mg). After 8 months of exposure the FUM was detected in the testing of TLC and HPLC in locations 07, 08 and 10. Location 09 and 11 showed bands only for the PRO in TLC and peaks with retention times similar to the PRO were obtained in HPLC. The FUM was not detected in any of the trials included in location 12. Tests were also performed in the laboratory where the material was subjected to styrene or pyrrolidine (processed products in industry) in order to verify the isolated action of these products. The material was collected periodically for testing of TLC, magnifying glass viewing and quantification of pigments (chlorophylls and phaeophytins). From the analysis of the TLC, the presence of bands related to the PRO and to the FUM was found in the material submitted to styrene. In the experiment with pyrrolidine there was the absence of bands related to the compounds produced by the species, demonstrating that the material was more sensitive to pyrrolidine than to styrene. From the quantification of pigments, a decreased production of chlorophyll and phaeophytins was observed in the material submitted to the styrene, besides the level of phaeophytin having overcome the level of chlorophyll. In the material submitted to pyrrolidine, there was an exacerbated production of phaeophytin (15.6 mg/mL). These results were confirmed by viewing the material under magnification where bigger changes were seen as to the coloring material submitted to pyrrolidine, which turned brown, reflecting high concentrations of phaeophytin. The results of the analysis of the material submitted to the industrial environment and to the contaminants in the laboratory confirm and indicate the location 12 as the one of highest risk of occupational contamination due to pyrrolidine.

Key words: *Cladonia verticillaris*, biomonitor, occupational contamination and fumarprotocetraric acid.

1 INTRODUÇÃO

As questões ambientais passaram a ser discutidas internacionalmente a partir da década de 70 com a realização da Reunião de Estocolmo (1972), onde a dimensão ambiental passou a ser vista como um fator importante para o desenvolvimento econômico. Em 1982 foi publicado “O relatório Brundtland” que consolidou uma crítica ao modelo de produção dos países industrializados e em desenvolvimento, ressaltando a incompatibilidade entre os padrões de produção, consumo e uso dos recursos naturais. Em 1992, foi realizada no Rio de Janeiro a "Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento" (Rio-92/Eco-92), onde foi criada a “Agenda 21” que consiste num programa de ações voltado para o desenvolvimento sustentável em todos os países. Este documento tem como questões primordiais as Mudanças do Clima e a Biodiversidade.

Acidentes com gases, problemas com a chuva ácida e, os crescentes níveis de poluição do ar nas cidades do mundo, são algumas das questões que despertaram a consciência ambiental mundial, pois a qualidade atmosférica repercute diretamente na qualidade de vida pública podendo causar grandes danos aos seres vivos em geral (FELLENBERG, 1980). Alguns poluentes possuem efeitos retardados, ao passo que outros são imediatos. Portanto, é imprescindível a detecção precoce de tais alterações para evitar ou solucionar possíveis problemas.

Apesar do desenvolvimento da industrialização ser um fato positivo na evolução econômica dos países, ela trás consigo a intensificação da poluição atmosférica através do aumento da emissão de gases decorrentes da utilização de combustíveis fósseis como fonte de energia, ou da volatilização destes quando utilizados como matéria-prima. A aceleração do processo de urbanização gera um efeito semelhante ao da industrialização em relação ao acréscimo de poluentes na atmosfera. Para a avaliação da qualidade do ar e dos impactos provenientes da poluição, têm sido realizados monitoramentos, principalmente em áreas urbanas

e industriais. Nessas áreas, a poluição com derivados do petróleo é evidente, cujos subprodutos geram graves impactos ao ambiente.

No contexto da indústria, a exemplo do uso de derivados de combustíveis fósseis como matéria-prima nas petroquímicas, tem-se em Pernambuco o processamento do estireno ($C_6H_5CHCH_2$), que consiste num líquido oleoso e incolor, classificado na categoria de compostos orgânicos voláteis e é listado como um dos poluentes perigosos do ar. É altamente reativo na atmosfera e contribui para formação de contaminantes secundários do ar (IPCS, 2009a). Outro produto químico utilizado neste tipo de indústria é a pirrolidina (C_4H_9N) um líquido claro com um desagradável cheiro de amônia e também tóxico (IPCS, 2009b).

O CONAMA, alerta para a necessidade do controle de emissão de contaminantes em ambientes diversos e, estabelece grau de tolerância aos seres vivos (RIOS, 2005). Visando conter o avanço dos problemas relacionados à poluição atmosférica, as indústrias estão sendo orientadas a adotarem técnicas que minimizem a poluição do ar, e já existem cotas de emissão de poluentes estipuladas para cada país. Segundo Cunha (2005) os poluentes lançados na atmosfera, associados aos fatores geoambientais como umidade, intensidade e direção predominante dos ventos, trazem sérios riscos ao meio ambiente. Eles podem ser dispersos quando integrados a correntes de ventos, ou serem concentrados em determinadas áreas em decorrência da existência de barreiras orográficas, agravando os níveis de poluição de algumas regiões. Por isso, torna-se necessário o monitoramento de amplas áreas.

Os dados relativos à composição atmosférica podem ser obtidos através de monitores mecânicos, porém sua utilização em larga escala torna-se inviável devido aos altos custos de instalação e manutenção dos equipamentos (SILVA, 2002).

Os seres vivos são sensíveis às modificações naturais ou antrópicas causadas aos ambientes, capacitando-os a indicar tais alterações. Estes são considerados indicadores biológicos

– bioindicadores – que nem sempre são eficientes nos ensaios de biomonitoramento, por não permitirem a quantificação dos poluentes. No entanto, alguns desses bioindicadores fornecem respostas qualitativas e mensuráveis, e dentro de certo nível de confiabilidade. Estes podem ser considerados como biomonitores, utilizados nos diagnósticos de áreas poluídas, nos distintos compartimentos do ecossistema. Com eles realiza-se o biomonitoramento, que consiste num estudo de organismos durante um determinado tempo comparando-os com um modelo, onde os desvios do esperado são avaliados (HAWKSWORTH, 1992; MARKERT, 1993; MOTA-FILHO *et al*., 2005).

Ao longo de décadas têm sido desenvolvidas técnicas e pesquisas que destacam a flora epífitica como indicadores biológicos. Dentre os componentes deste tipo de vegetação, merece destaque o líquen, que é uma associação entre um fungo e uma ou mais espécies de algas (XAVIER-FILHO *et al*., 2006), com eficácia comprovada na indicação e monitoramento da qualidade do ar por possuir nutrição higroscópica, alto poder fixador tornando possível a mensuração de poluentes através da análise de seu desempenho e características do seu talo. Seu uso viabiliza não apenas a bioindicação, mas também o biomonitoramento, com estabelecimento de escalas quantitativas e qualitativas para avaliação dos índices de contaminação de áreas com as mais diversas características de poluição atmosférica.

No Nordeste do Brasil, o biomonitoramento da qualidade do ar vem sendo realizado, com comprovada eficácia do líquen *Cladonia verticillaris.* A espécie foi avaliada sob condições ambientais, e em experimentos controlados em laboratório (SILVA, 2002; CUNHA, 2005; FREITAS, 2006; MOTA-FILHO, 2006). Oliveira (2007) também comprovou a utilidade da espécie no biomonitoramento em área industrial de uma petroquímica no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, através da observação de distúrbios na produção de seus metabólitos secundários, tanto os ocorrentes no córtex como na medula, após oito meses de

exposição. Tais disfunções fisiológicas foram mais intensas em pontos próximos às unidades de processamento da pirrolidina e do estireno.

Neste trabalho é dada continuidade à investigação realizada em ambiente industrial, transpondo para o laboratório os estudos com os contaminantes (estireno e pirrolidina) isoladamente, sob condições controladas, e análise detalhada das amostras utilizadas no monitoramento industrial. Através da comparação desses resultados foi possível confirmar ou não a fonte de contaminação que causou tais alterações fisiológicas no material exposto, bem como, através das respostas do biomonitor, indicar os riscos aos trabalhadores que manuseiam diretamente tais produtos, ou aqueles de unidades vizinhas à de sua produção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Intoxicação ocupacional

A utilização de técnicas inadequadas de produção é uma questão que traz grandes riscos à saúde humana e ao ambiente. No incremento da produção agrícola tem-se usado intensivamente agrotóxicos (inseticidas, herbicidas e fungicidas) e fertilizantes (ECOBICHON, 2001). Os agricultores não costumam usar equipamento de proteção individual e nem recebem treinamento devido para a correta preparação, aplicação e disposição de embalagens vazias de produtos tóxicos. Tal situação resulta na facilidade de intoxicação ocupacional dos trabalhadores, da população consumidora, dos produtos agrícolas e do ambiente (solo, atmosfera e corpos de água) (OLIVEIRA-SILVA *et al*., 2000).

Outra atividade econômica que apresenta altos riscos de contaminação ocupacional é a mineração. Na exploração do ouro, o mercúrio é amplamente utilizado para a formação do amálgma, que facilita a aglutinação das partículas finas. A contaminação ocupacional se dá pela inalação de vapores desse elemento que pode causar danos aos sistemas respiratório e nervoso (NOGUEIRA *et al*., 1997).

O departamento da construção civil apresenta aos trabalhadores risco de desenvolvimento de doenças pulmonares devido à presença em larga escala de aerodispersóides (poeiras). No Brasil a principal doença ocupacional desenvolvida pelos trabalhadores é a silicose, já que o país emprega grande contingente neste setor (SOUZA; QUELHAS, 2003).

O setor industrial também apresenta várias atividades que trazem grandes riscos de intoxicação aos trabalhadores, como por exemplo, a produção de baterias chumbo-ácidas e a produção de lâmpadas fluorescentes (contaminação com mercúrio). No domínio das atividades industriais, as petroquímicas merecem destaque quanto ao risco de intoxicação ocupacional, pois

processam substâncias altamente tóxicas na maioria das vezes de fácil volatilização, que provocam a contaminação de trabalhadores e do meio ambiente (ZAVARIZ; GLINA, 1993).

Numa petroquímica situada no Cabo de Santo Agostinho-PE tem-se o processamento do estireno ($C_6H_5CHCH_2$), hidrocarboneto aromático não saturado, de fácil volatilização (a partir de 20°C), podendo alcançar uma concentração nociva no ar, lentamente, sendo um risco para as localidades de clima quente (IPCS, 2009a).

Em relação à saúde humana, pode produzir sensibilidade na pele através do contato com o líquido, irritação nos olhos através da exposição aos vapores e, em casos de inalação prolongada ou repetida, provoca asma e também pode afetar o sistema nervoso central. Este material foi classificado pelo *International Agency for Research on Cancer* - IARC como grupo 2B (possível cancerígeno para seres humanos) (IPCS, 2009a).

Nesta indústria também ocorre o processamento da pirrolidina (C_4H_9N) que é um composto orgânico da classe das aminas, com odor desagradável semelhante ao da amônia. Volatiliza-se aos 20°C e possui densidade maior do que o ar, podendo contaminar o solo. A exposição humana ao produto pode causar danos como queimaduras na pele, tosse, dores na garganta, dores de cabeça, vômito e convulsão (IPCS, 2009b).

Diante dos riscos apresentados por tais substâncias, tanto aos seres humanos quanto ao meio ambiente, mostra-se relevante o monitoramento da qualidade do ar. Nesse contexto, merece destaque a prática de biomonitoramento utilizando liquens, que vem sendo realizada com sucesso em regiões urbanas e industriais.

2.2 Líquen e seu funcionamento

Os liquens são seres de difícil posicionamento nos reinos dos seres vivos, por serem resultantes de uma associação simbiótica entre alga e fungo, denominada liquenização. Em decorrência dessa dificuldade existem várias definições para líquen. Segundo Marcelli (2006), a idéia mais simples que se pode ter é a de um fungo que cultiva fotobionte - parte clorofilada da simbiose liquenica, ou seja, a alga - entre as hifas - unidade estrutural do fungo - de seu micélio. A simbiose entre estes organismos distintos, onde a alga, que é clorofilada e, portanto capaz de realizar a fotossíntese, e o fungo aclorofilado e heterótrofo, conferem ao líquen um funcionamento não observado em nenhum outro grupo taxonômico (NASH, 1996; MARCELLI, 2006).

O fotobionte e o micobionte se posicionam de forma peculiar dentro do talo liquênico em camadas sucessivas, ou seja: o córtex superior composto de hifas do fungo entrelaçadas, visando proteger a camada das algas, que vem logo abaixo, protegida por outro feixe de hifas frouxas, a medula, seguida de outro feixe de hifas, o córtex inferior (HALE-JR, 1983) (figura 01).

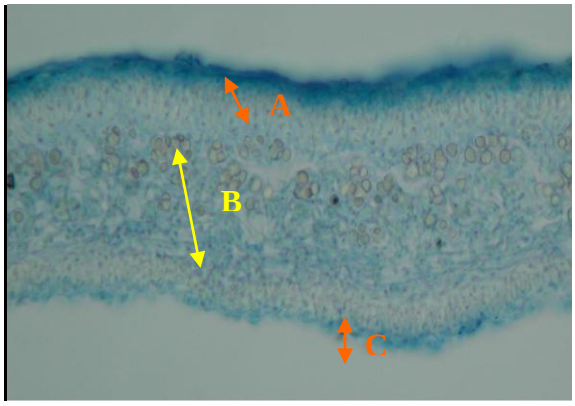

Figura 01: Estrutura do talo liquênico. (A) Córtex superior; (B) Camada das algas; (C) Córtex inferior.
Fonte:< http://www.sci.muni.cz/lichens> Acesso em: 09 de abr. 2010.

É nessa estrutura complexa que são produzidas substâncias resultantes do metabolismo secundário denominadas substâncias liquênicas. Atualmente sabe-se que sua natureza é quase na totalidade fenólica (NASH, 1996) e são essas substâncias responsáveis pela maioria dos benefícios advindos dos liquens (LLANO, 1951). Os fenóis produzidos pelo líquen promovem a defesa do talo frente a agressões ambientais, como o estresse hídrico, ou contaminação do ar. As substâncias, após biossíntese no interior do micobionte, são excretadas e cristalizadas na superfície da hifa. Isto confere ao líquen uma proteção contra as adversidades. Estas substâncias são produzidas tanto no córtex como na medula, sendo translocadas, quando insuficientes para proteção do talo (MAZZITELLI *et al*., 2006).

Por isso, os liquens são encontrados em várias regiões do mundo e, geralmente sobrevivem mesmo quando em áreas submetidas a condições climáticas severas. Mesmo assim, são muito sensíveis à poluição do ar atmosférico (SEAWARD, 1977; 1993), tendo sido utilizados como bioindicadores porque diferentemente dos vegetais superiores, não dependem de um sistema radicular para absorção de nutrientes e, incorporam higroscopicamente, com facilidade, altos níveis de poluentes (PILEGAARD, 1978), assim como dos nutrientes necessários à sua sobrevivência (SEAWARD, 1977; NASH, 1996).

2.3 Líquen como biomonitor

A pureza do ar atmosférico é um fator crucial à sobrevivência dos liquens, visto sua enorme capacidade de fixar e acumular os elementos nele dispersos, notadamente o nitrogênio. Estes seres absorvem e retém elementos radioativos, íons metálicos, dentre outros poluentes, o que possibilita sua utilização como indicadores biológicos de poluição atmosférica (NIEBOER *et al*., 1972; SEAWARD, 1977,1993; FREITAS *et al*., 2000; LOPPI, 2001; MAZZITELLI *et al*.,

2006), funcionando como filtros altamente desenvolvidos no monitoramento do ar e também da chuva (HAWKSWORTH, 1990).

A relevância do biomonitoramento com liquens se dá pelo maior conhecimento da qualidade do ar, pela utilização de recursos naturais (sem sua depredação) e, pelos ensaios técnico-científicos de baixo custo. Carneiro (2004) alerta que se torna difícil realizar um sistema abrangente de monitoramento, devido à sofisticação dos métodos físico-químicos convencionais, que demandam custos elevados de implantação, operação e manutenção, custos estes, que podem ser minimizados pela adoção de metodologia complementar. O método pode utilizar liquens ocorrentes na área a ser estudada (biomonitoramento passivo), ou realizar transplantes para que se tenha conhecimento do processo em "tempo zero", por um período determinado, enfocando a área problema, ou um emitente em particular (biomonitoramento ativo) (LE BLANC & RAO, 1975; SILVA, 2002).

À exemplo dos estudos neste âmbito foi realizado na cidade de Hadera, em Israel, um trabalho para analisar o impacto na poluição do ar de uma estação de energia movida a carvão mineral. Amostras de *Ramalina lacera* foram coletadas numa floresta e, transplantadas para 10 pontos nas proximidades da estação. Após 7 meses os liquens foram coletados e submetidos a análises do potencial fotossintético, produção de etileno e condutividade elétrica do talo. Os danos fisiológicos coincidiram com as concentrações de determinados elementos, inclusive metais pesados. Foi possível constatar que a cidade de Hadera é menos poluída do que a região de Ashdode e a Baía de Haifa. Pode-se reafirmar a aplicabilidade de liquens para a realização de biomonitoramento da qualidade do ar (GARTY *et al*., 2002).

Na Itália foi realizado um estudo de biomonitoramento utilizando líquen, que teve como principal objetivo detectar as concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em alguns pontos da cidade de Rieti. O material foi coletado em área livre de poluição sendo

medidas concentrações de HPAs antes da montagem e instalação dos experimentos em oito diferentes pontos. O material foi coletado a cada cinco meses e submetido a análises para detecção dos níveis de HPAs. Os pontos que apresentaram maiores níveis de concentração de fenatreno, antraceno, fluoranteno e pireno foram os localizados em áreas de tráfego veicular intenso. Foi constatado um incremento de poluentes entre os meses de setembro e fevereiro devido à utilização de aquecedores domésticos (GUIDOTTI *et al*., 2003). Resultados semelhantes foram encontrados numa pesquisa realizada na cidade de DehraDan (UPRETI; SHUKLA, 2008). Tais pesquisas demonstram a importância da urbanização no aumento da poluição atmosférica.

Na cidade de Córdoba realizou-se um estudo visando a implementação do biomonitoramento com líquen como política pública. O trabalho consistiu na elaboração de um mapa com áreas homogêneas de distribuição de liquens associados à qualidade de vida. Os dados foram obtidos a partir de estudos prévios de determinação do índice de poluição do ar (IPA) da área em estudo. A partir dos resultados foi elaborada uma proposta para implementar um sistema de monitoramento da cidade (ESTRABOU, 2009).

No Brasil, Saiki *et al*. (2007) realizou um trabalho para determinar os elementos traço presentes em *Canoparmelia texana* coletada em áreas não poluídas da mata Atlântica e em 6 diferentes pontos do município de Santo André (SP). Os resultados confirmaram a utilidade da espécie em técnicas de biomonitoramento de elementos traço presentes na atmosfera em áreas urbanas.

Na Região Metropolitana de São Paulo foi realizado um biomonitoramento com *C. texana* e foi possível constatar que os poluentes encontrados acima dos níveis toleráveis estavam associados ao complexo petroquímico, à atividade de uma metalúrgica e do alto tráfego veicular.

A partir da análise exploratória dos resultados foi constatado que a área apresenta grandes riscos à saúde humana quanto ao desenvolvimento de doenças cardiopulmonares (FUGA *et al*., 2008).

Apesar da discussão existente em torno da importância das áreas de preservação no meio urbano, alguns estudos vêm demonstrando sua importância. Em Porto Alegre foi realizado um levantamento de algumas espécies liquênicas com talo folioso e fruticoso que se desenvolvem no córtex de algumas árvores do Jardim Botânico localizado na área urbana da cidade. Os resultados mostraram a presença de espécies típicas de áreas alteradas e de áreas preservadas, demonstrando a importância das áreas de preservação em meios urbanos (LUCHETA & MARTINS, 2009).

Na região Nordeste, Cáceres (1996) realizou um biomonitoramento passivo no campus da UFPE. A área foi dividida em quadrantes onde foram coletadas duas espécies liquênicas (*Parmotrema praesorediosum* e *Leptogium* sp*)* para detecção dos teores de clorofilas e feofitinas. Os resultados demonstraram que as espécies comportaram-se de maneira semelhante apresentando três situações: baixos teores de pigmentos, teores de feofitinas (clorofila degradada, pela perda do íon de magnésio contido no centro de sua estrutura química) quase iguais aos de clorofilas, ou teores de feofitinas superiores aos de clorofilas. Todas as situações demonstram a sensibilidade das espécies aos poluentes provenientes do tráfego de veículos. O biomonitoramento nesta área foi atualizado por Silva *et al*. (2009) através da determinação do Índice de Pureza Atmosférica (IPA). Em relação ao trabalho de 1996 constatou-se que a mudança paisagística e o aumento do fluxo de veículos com criação de novas rotas influenciaram na redução da diversidade liquênica local.

Silva (2002) realizou um biomonitoramento da qualidade do ar usando o líquen *C. verticillaris* no município de Jaboatão dos Guararapes-PE. Os experimentos foram instalados próximos aos monitores mecânicos da CPRH (Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos

Hídricos) e, os resultados das análises químicas, fisiológicas e da superfície externa do líquen foram comparados com os dados dos monitores mecânicos, sendo comprovada a utilidade do líquen como biomonitor em área urbana.

Em Vertente do Lério, Agreste de Pernambuco, Cunha (2005) utilizou a mesma espécie em área de extração e beneficiamento do calcário, delimitando áreas com distintos níveis de poluição. Com objetivo similar, Mota-Filho *et al*. (2007) avaliaram a contaminação com chumbo em Belo Jardim (PE), determinando a área de influência/abrangência do metal, quando utilizado em fábricas a partir do seu reuso. Freitas (2006) também usou *C. verticillaris* para analisar a qualidade do ar no Complexo Industrial e Portuário de Suape (PE), identificando os pontos e as indústrias mais impactantes da área, mediante respostas químicas, fisiológicas e estruturais do líquen. Em virtude da eficácia de *C. verticillaris* em experimento de transplante, bem como ensaios sob condições laboratoriais, é prudente indicar o uso desta espécie, sempre que possível.

Villarouco *et al*. (2007) realizaram um ensaio em laboratório para avaliar o desempenho de *C. verticillaris* submetida a estireno e ciclohexano. Os resultados demonstraram a síntese de substâncias intermediárias e diminuição da produção de seu principal composto que é o ácido fumarprotocetrárico (FUM). Cruz *et al*. (2009) realizaram um estudo semelhante utilizando *Cladia aggregata* como biomonitor. Este trabalho teve como finalidade identificar a toxidade do formaldeido em ambientes fechados (*indoor*). Ao fim do experimento foi observado um decréscimo na produção do ácido barbático, principal composto sintetizado pela espécie.

Neste contexto, Oliveira (2007) obteve resultados indicativos de pontos com distintos níveis de poluição, no perímetro de uma indústria petroquímica do Cabo de Santo Agostinho (PE). Os contaminantes assimilados por *C. verticillaris* interferiram na produção e/ou degradação de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e feofitinas), ou que interferiu no metabolismo da espécie, sobretudo na produção de fenóis, substâncias protetoras e mantenedoras da integridade

do talo. Esses produtos liberados no ambiente industrial podem ser resultantes de emissões fugitivas de produtos manufaturados naquela unidade, ou matéria prima usada para produção de polímeros.

Por isso, este estudo continua no intento de quantificar a perda do FUM, composto principal da espécie, correlacionando seus teores às linhas de produção da indústria. Ao mesmo tempo, determinar em condição laboratorial, a resposta da espécie frente aos produtos manufaturados, ou usados como matéria prima, isoladamente, para identificar os mais agressivos e quais deles podem causar maiores danos ocupacionais, diretos ou indiretos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e armazenamento do material liquênico

Cladonia verticillaris (figura 02) e seu substrato de origem (solo) foram coletados numa mancha de Cerrado (tabuleiro) na Serra da Prata (9.022 latitude /36.792 longitude), no município de Saloá - Agreste Pernambucano (figura 03). Apesar da área situar-se a 1086 m de altitude, e apresentar relevo e clima favoráveis ao desenvolvimento de uma vegetação semelhante à mata Atlântica, a presença de Neossolos Quartzarênicos viabiliza o aparecimento de espécies características do Cerrado. A área foi selecionada para coleta por apresentar-se livre de fontes emissoras de poluentes.

Os liquens e o solo foram acondicionados em caixas de papel à temperatura ambiente (28 ± 3ºC) até sua utilização. Parte do material encontra-se depositado no Herbário UFP do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, voucher 59.258.

Figura 02: *Cladonia verticillaris* em ambiente natural – Saloá-PE
Foto: Autora

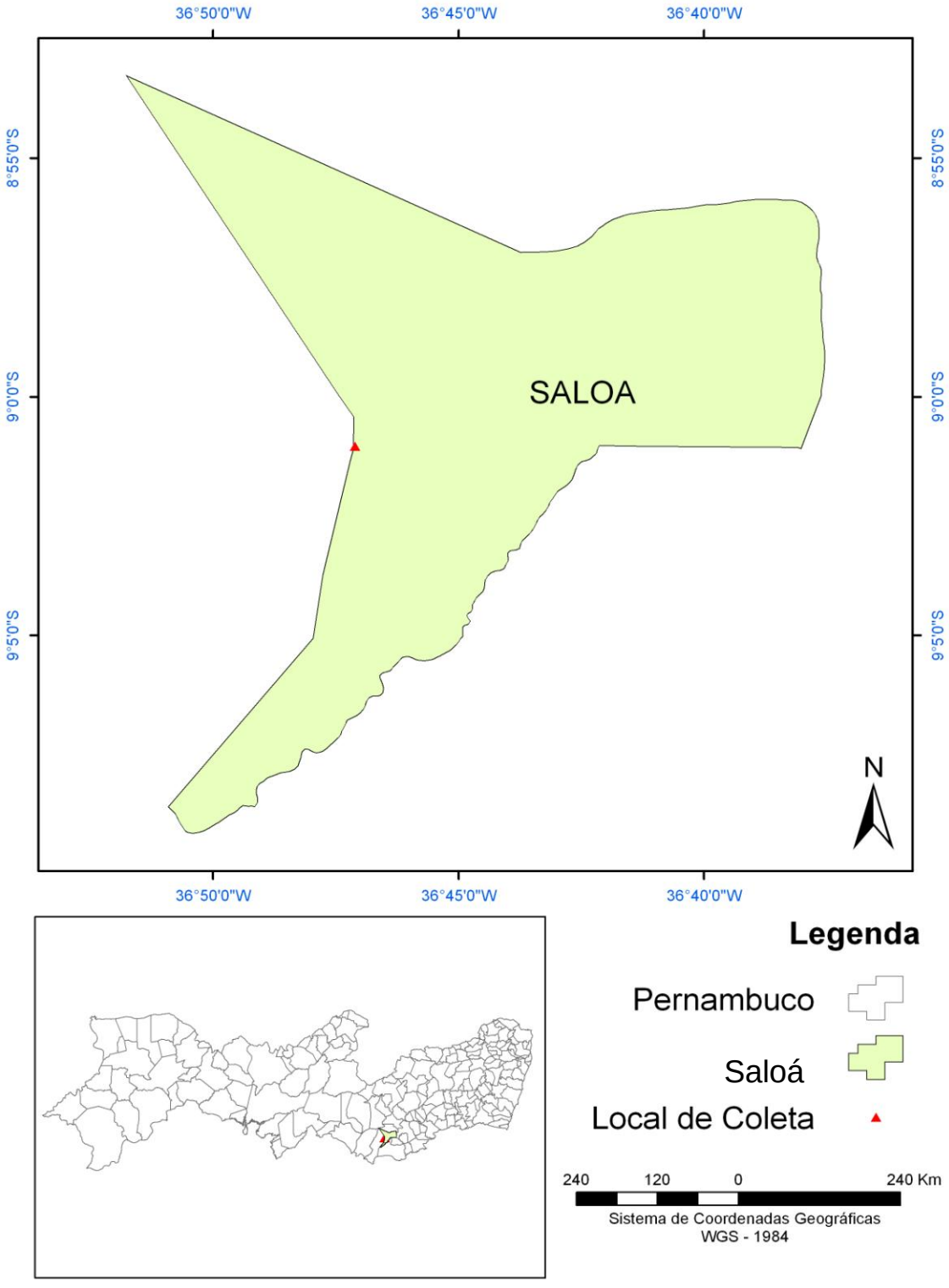

Figura 03: Localização da área de coleta de liquens e solo, Saloá-PE.
Fonte: Silva (2007)

3.2 Avaliação do material exposto ao ambiente industrial

Amostras de *C. verticillaris* foram monitoradas por 8 meses em ambiente industrial de uma petroquímica no Cabo de Santo Agostinho (PE). Foram selecionados 12 diferentes pontos (figura 04), em função das unidades de produção. Os experimentos foram montados a partir da deposição dos liquens em recipientes plásticos cortados longitudinalmente, preenchidas com o solo coletado em seu *habitat* natural.

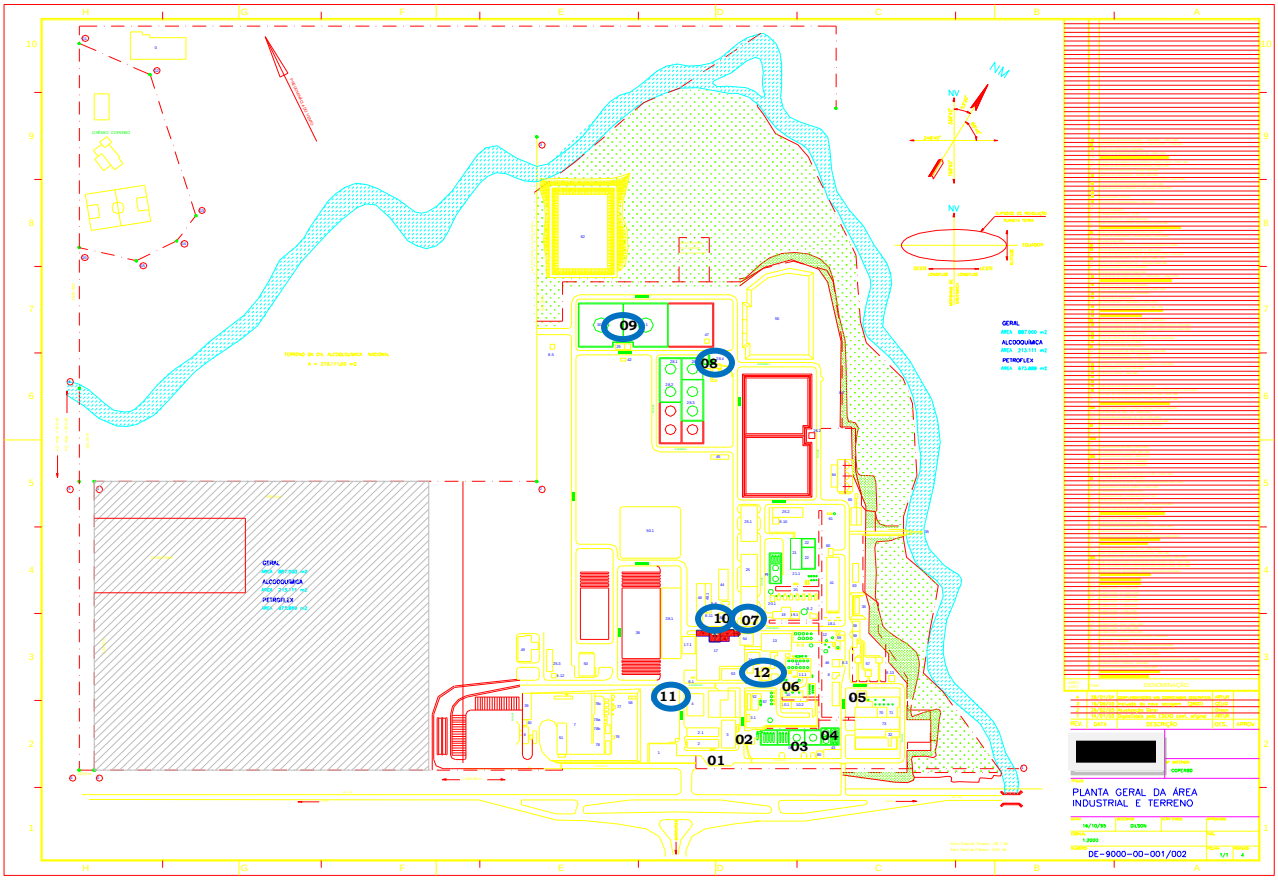

Figura 04: Planta da indústria com localização dos 12 pontos com experimentos.

Em trabalhos anteriores, análises de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e feofitinas) e fenóis, demonstraram que 6 dos 12 pontos amostrados mereciam estudo detalhado, em função das respostas diferenciadas de *C. verticillaris*, destacados em azul na figura 04. Foram selecionados:

ponto 07- pavimento superior da coagulação 2800 (figura 05); ponto 08 - Bomba de estireno (figura 06); ponto 09 - Base da esfera de armazenamento (figura 07); ponto 10 - Área vegetada utilizada como lazer (próximo à oficina COMAL - 2800) (figura 08); ponto 11 - Área vegetada com viveiro de passarinhos utilizada como lazer (próximo à expedição) (figura 09); ponto 12 - Área de armazenamento da pirrolidina (área 2300) (figura 10)

As amostras de *C. verticillaris*, que foram expostas ao ambiente industrial em 06 diferentes pontos, foram avaliadas quanto ao teor de fenóis corticais e medulares, com ênfase à produção de sua principal substância, o FUM e seus compostos minoritários, o PRO e a atranorina (ATR). As análises foram feitas através da realização de ensaios de CLAE no material após 1 e 8 meses de experimento como descrito no item 3.4.3, e CCD no material após 8 meses de experimento como descrito no item 3.4.2., com finalidade de identificar áreas de possíveis riscos de intoxicação ocupacional.

Figura 05: Ponto 07-pavimento superior da coagulação 2800
Foto: Martins & Lima (2005)

Figura 06: Ponto 08- Bomba de estireno
Foto: Martins & Lima (2005)

Figura 07: Ponto 09-Base da esfera de armazenamento do estireno
Foto: Martins & Lima (2005)

Figura 08: Ponto 10- Área vegetada utilizada para lazer (próximo à oficina Comal - 2800)
Foto: Martins & Lima (2005)

Figura 09: Ponto 11- Área vegetada com viveiro de passarinhos utilizada para lazer (próximo à expedição)
Foto: Martins & Lima (2005)

Figura 10: Ponto 12- Área de armazenamento da pirrolidina (área 2300)
Foto: Martins & Lima (2005)

3.3 Ensaios sob condições laboratoriais

Para o estudo da ação isolada de cada substância da linha de produção na indústria petroquímica sobre *C. verticillaris,* a espécie foi submetida em laboratório a diferentes experimentos com estireno ou pirrolidina.

Tufos com cerca de 10g de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., foram dispostos sobre 320 g do seu substrato (solo) e acondicionados em recipientes com cúpula transparente, localizados sob condições naturais de luminosidade (figura 11).

No experimento controle borrifaram-se aproximadamente 2mL de água deionizada e, no material teste aproximadamente 2 mL de estireno ou pirrolidina, a cada 5 dias, por 15 dias consecutivos (figura 12).

Foram coletadas amostras de *C. verticillaris* após 3, 5, 10, 15 e 30 dias, que foram submetidas a extração e análise de seus compostos.

Figura 11: Montagem do experimento com *C. verticillaris* em laboratório

Figura 12: Experimento sendo borrifado com água ou contaminante

No fim do experimento (após um mês de montagem), o material foi submetido à análise de clorofilas e feofitinas e análise morfológica em lupa.

3.4 Análise morfológica e química do material teste

3.4.1 Obtenção dos extratos orgânicos - fenóis corticais e medulares

Os fenóis corticais foram obtidos mediante lavado superficial do talo liquênico com acetona, durante 30 min (figura 13). Em seguida, o mesmo talo foi submetido à maceração no mesmo solvente por 24 horas para obtenção dos fenóis medulares. Todos os extratos foram evaporados à temperatura ambiente (28 ± 3°C) e analisados por cromatografia.

Figura 13: Extração dos fenóis corticais e medulares de *Cladonia verticillaris*

3.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos orgânicos foram submetidos a CCD ascendente, unidimensional (CULBERSON, 1972). Amostras foram aplicadas sobre placas de sílica Gel $F_{254+366}$ Merck, e desenvolvidas nos sistema de solventes B (hexano/ éter dietílico/ ácido fórmico, 130:80:20, v/v).

Após evaporação dos solventes as placas foram reveladas sob luz UV curta e longa (figura 14), e posteriormente pulverizadas com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 100ºC por 20 minutos (figura 15).

Figura 14: Câmara de luz

Figura 15: Chapa aquecedora das placas cromatográficas

3.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os ensaios em CLAE seguiram a metodologia de Legaz e Vicente (1983), em cromatógrafo líquido Hitachi acoplado em detector de UV a 254nm, coluna C18 de fase reversa, usando metanol/ água/ ácido acético (80:19,5:05, v/v) como fase móvel, em sistema isocrático (figura 16).

Os resultados foram avaliados mediante tempo de retenção das substâncias na coluna e, área dos picos cromatográficos, comparados ao do padrão de FUM.

Figura 16: Cromatógrafo líquido

3.4.4 Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos

As clorofilas e feofitinas foram obtidas através de extrações realizadas com 200mg de talo imersos em 10mL de acetona a 80%, mantidos no escuro por 48 horas. Após este período o material foi filtrado e lido em espectrofotômetro BIOCHORM,modelo Libra 522 (figura 17) em quatro comprimentos de onda (536nm, 645nm, 663nm e 666nm). Os resultados das leituras foram aplicados nas seguintes fórmulas para obtenção dos teores de clorofilas **a** e **b** (HILL, 1963) e feofitinas **a** e **b** (VERNON, 1960).

Clorofila **a**: 12,7 x A663 – 2,69 x A645 Feofitina **a**: 21,67 x A666 - 17,42 x A536

Clorofila **b**: 22,9 x A645 – 4,80 x A663 Feofitina **b**: 31,90 x A536 - 13,40 x A666

Figura 17: Espectrofotômetro

3.4.5 Avaliação morfológica de amostras submetidas a contaminantes

O material proveniente do experimento em laboratório foi visualizado e fotografado em lupa (modelo: Leica - zoom 2000) (figura 18), com finalidade de identificar alterações visíveis

macroscopicamente quanto à morfologia externa e coloração, do líquen submetido aos contaminantes.

Figura 18: Lupa estereoscópica

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do material exposto ao ambiente industrial

Avaliando a natureza dos pontos, o ponto 07 (figura 05) foi selecionado para realização de ensaios quantitativos por ter apresentado em dois meses produção de clorofilas semelhante ao material tempo zero (aproximadamente 2,5 mg/mL), e produção do ácido fumarprotocetrárico (FUM) e ácido protocetrárico (PRO) ao longo dos oito meses de experimento (OLIVEIRA, 2007).

Os pontos 08 (figura 06) e 09 (figura 07) apesar de aparentemente estarem expostos ao mesmo poluente, apresentaram comportamentos distintos quanto a produção de fenóis; no 08 constatou-se a síntese do FUM e do PRO; no 09 houve apenas a síntese do PRO (OLIVEIRA, 2007) merecendo uma averiguação mais minuciosa.

Os pontos 10 (figura 08) e 11(figura 09) estão em áreas vegetadas, utilizadas para lazer dos funcionários da indústria. Neles também foram detectados comportamentos diferenciados, sendo identificadas no ponto 11 altas concentrações de feofitinas e ausência do FUM.

O ponto 12 (figura 10) foi o que apresentou o pior desempenho sendo constatada a ausência da produção de fenóis após oito meses de exposição ao ambiente industrial. Esta área é considerada de alto risco de contaminação ocupacional por armazenar pirrolidina.

Estudos prévios apontam que os fenóis participam no mecanismo de defesa do talo liquênico frente a agressões ambientais, como o estresse hídrico, contaminação do ar e radiação (LAWREY, 1986; RUNDEL, 1987). Estas substâncias são produzidas em locais específicos no talo, e após biossíntese no interior do micobionte, são excretadas e cristalizadas na superfície da hifa dos fungos, funcionando como fotoprotetores ou fotoindutores (SEAWARD,1977; NASH,1996; MAZZITELLI *et al*., 2006).

O principal composto produzido por *Cladonia verticillaris* é o FUM, mas estão presentes também no seu talo o PRO e a ATR (AHTI *et al.*, 1993).

Ensaios de CLAE utilizando o FUM como padrão e extratos dos fenóis totais do líquen antes da exposição ao ambiente industrial (tempo zero) indicaram que o FUM teve tempo de retenção de 4,61 min (figura 19 a). *C. verticillaris* logo após a coleta (tempo zero) apresentou um pico com tempo de retenção aos 5,12 min (figura 19 b) que refere-se a um teor de 0,8 mg/mg de FUM.

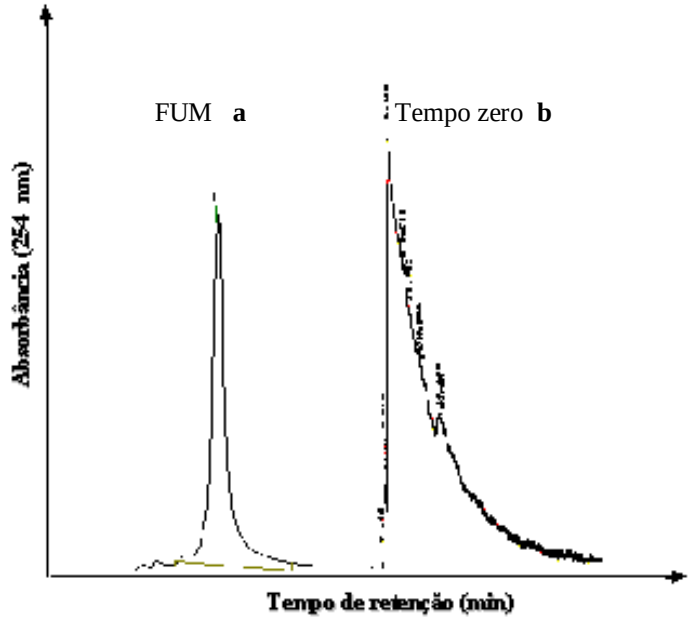

Figura 19: Cromatografia liquida de alta eficiência do padrão (FUM) - **a** e de *Cladonia verticillaris* tempo zero - **b**.
Legenda: absorbância a 254 nm (eixo y) e tempo de retenção em minutos (eixo x).

Após um mês de experimento todas as CLAEs referentes aos seis pontos apresentaram um pico com tempo de retenção que indicam a presença do FUM (figura 20). Os teores encontrados foram semelhantes à do material tempo zero (tabela 1).

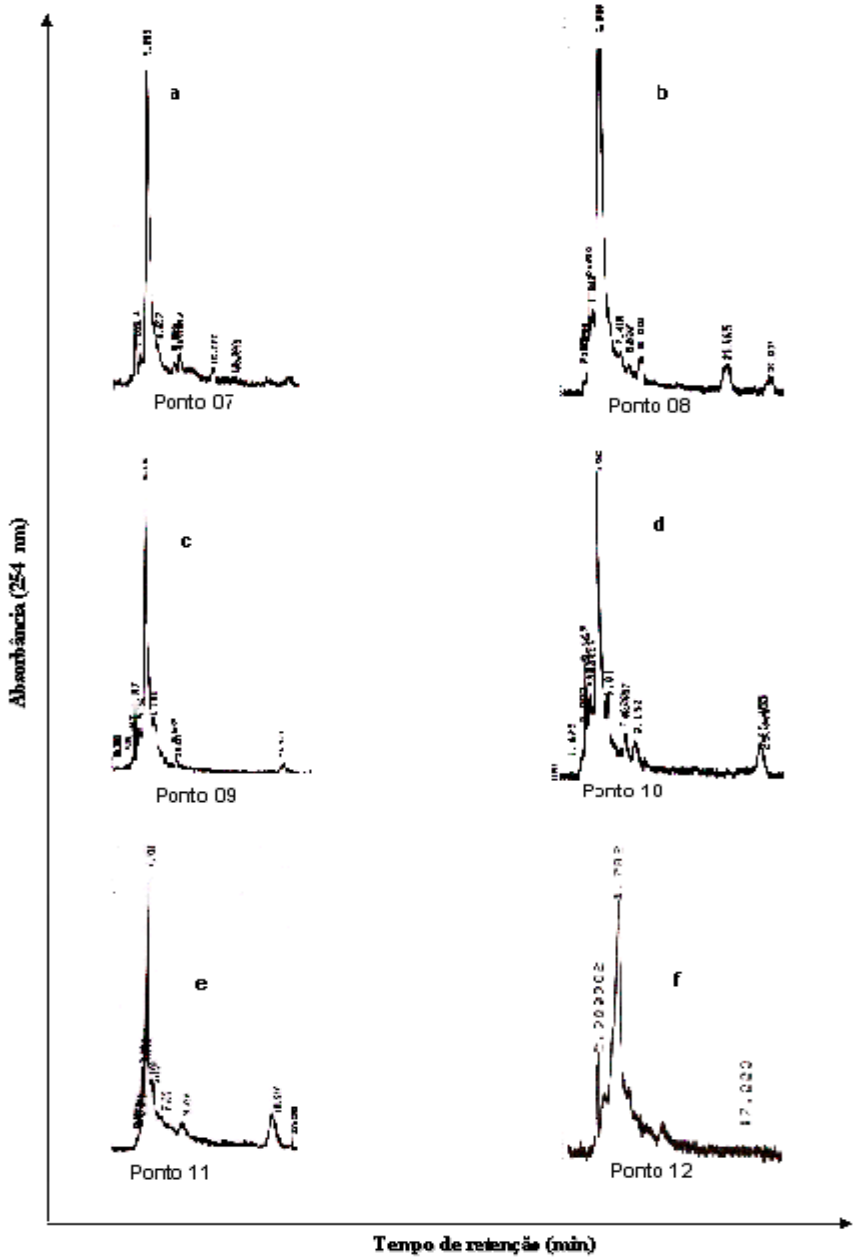

Figura 20: Cromatografia liquida de alta eficiência de *Cladonia verticillaris* após um mês de exposição ao ambiente industrial.
Legenda: absorbância a 254 nm (eixo y) e tempo de retenção em minutos (eixo x).

Tabela 1: Tempo de retenção e concentração de FUM de *C. verticillaris* após 1 e 8 meses de exposição ao ambiente industrial

Amostra	Tempo de Retenção (min) 1 mês	Concentração de FUM (mg/mg) após 1 mês	Tempo de Retenção (min) 8 meses	Concentração de FUM (mg/mg) após 8 meses
07	5,29	0,90	4,84	0,50
08	5,08	0,82	4,43	0,30
09	5,14	0,95	3,15	-
10	4,82	0,69	4,82	0,90
11	4,93	0,71	6,05	-
12	4,70	0,86	7,19	-
Tempo zero	5,12	0,80		

* concentração de FUM em mg de substância por mg de talo.

Após um mês, os pontos 7, 8 e 9 pareceram mais preservados, pois o líquen produziu o FUM em teores aproximados ao do material logo após coleta; já os pontos 10, 11 e 12 os picos dos cromatogramas têm tempo de retenção inferior ao do FUM e com teores desta substância também reduzidos. É possível que nesta etapa tenha havido uma diminuição da síntese do FUM, ou sua degradação no interior da célula, fato também reportado para esta espécie por Silva (2002) quando submeteu a espécie a ambiente urbano em Jaboatão dos Guararapes.

É possível que após oito meses de exposição, os contaminantes e agentes atmosféricos tenham influenciado no funcionamento de *C. verticillaris.* A CLAE relativa ao material liquênico posicionado no ponto 07 por oito meses (figura 21 a) apresenta um pico com tempo de retenção de 4,84 min, sendo o teor do FUM nesta amostra de 0,5 mg/mg (tabela 1). Estes dados confirmam as observações de Oliveira (2007), que além de avaliar qualitativamente os fenóis de *C. verticillaris* submetida ao ambiente industrial, também analisou a produção de pigmentos (clorofilas e feofitinas) e constatou após o sétimo mês de exposição, uma produção de clorofilas

(2,5 g/L) igual a do material tempo zero, evidenciando que apesar da diminuição do teor de FUM, o local apresenta boa qualidade do ar e baixos riscos de intoxicação ocupacional.

Ao se observar a CLAE de *C. verticillaris* posicionada no ponto 08 durante oito meses (figura 21 b) é possível identificar a presença do FUM através do pico com tempo de retenção 4,43 min. O teor do composto passou de 0,82 mg/mg para 0,3 mg/mg (tabela 1) demonstrando que apesar da diminuição da produção do composto, o líquen está sintetizando sua principal substância.

Na CLAE de *C. verticillaris* posicionada no ponto 09 após um mês de exposição o teor de FUM era de 0,95 mg/mg. (tabela 1), após oito meses de exposição ocorre apenas um pico com tempo de retenção semelhante ao do PRO (figura 21 c) confirmando o resultado da análise qualitativa. A síntese do fumarprotocetrárico é precedida pela formação da atranorina que em etapas sucessivas gera o ácido hipoprotocetrárico e seu aldeído, que vão dar origem ao ácido protocetrárico. A partir do acoplamento de uma porção de fumarato ao PRO é que o fumarprotocetrárico é sintetizado (PEREIRA *et al.*, 1999). Para isto é necessário o envolvimento de enzimas nas etapas metabólicas (FONTANIELLA *et al.*, 2002). Este processo pode ser induzido ou inibido por algum íon poluente (SILVA, 2002; MOTA-FILHO, 2006). Certamente o material foi submetido aos vapores de estireno, já que o experimento foi montado na base da esfera de armazenamento do material e, por isso, captou o produto volatilizado, que atuou em alguma etapa biossintética. Tais disfunções apresentadas pelo líquen sugerem que a área apresenta riscos de intoxicação aos trabalhadores.

No ponto 10, após oito meses de experimento observa-se na CCD (figura 22), a presença de uma banda referente ao FUM. E este resultado é ratificado pela CLAE (figura 21 d) onde ocorre a presença de um pico com tempo e retenção 4,82 min e um teor de 0,9 mg/mg (tabela 1) de FUM. Neste ponto houve até um aumento da síntese do FUM já que após um mês de

exposição foi registrado o teor de 0,62 mg/mg nesta amostra (tabela 1). Os valores encontrados após o período de exposição são semelhantes aos da amostra tempo zero (0,8 mg/mg), fato que comprova que o material não sofreu alterações fisiológicas. Portanto, entre os pontos selecionados, o 10 demonstrou maior salubridade dentre os demais e, pode ser considerado livre dos riscos de contaminação ocupacional.

Já no ponto 11 apesar de ser uma área também vegetada e considerada de lazer, na CCD (figura 22) identificou-se apenas a presença de uma banda referente ao PRO. Na CLAE (figura 21 e) resultante do material após um mês de exposição foi detectado um teor de 0,71 mg/mg, após oito meses (tabela 1) não foi identificado nenhum pico com tempo de retenção semelhante ao do FUM demonstrando a ausência deste composto na amostra. A contaminação deste local se deu possivelmente em decorrência dos vapores trazidos pelos ventos da área de armazenamento da pirrolidina, sendo portanto, considerada com alto risco de contaminação ocupacional.

O ponto 12 foi o que apresentou maiores disfunções a partir da análise qualitativa, já que na CCD (figura 22) ocorreu a ausência de bandas. Na CLAE do material após um mês de experimento foi constatado um teor de 0,86 mg/mg de FUM (tabela 1), após oito meses de experimento não foi identificado nenhum pico com tempo de retenção semelhante aos principais compostos sintetizados por *C. verticillaris* (figura 21 f). O local provavelmente apresenta altos teores de vapores da pirrolidina, já que é a área de estocagem do produto. Estes vapores também podem estar sendo transportados pelos ventos e contaminando as proximidades do ponto11, pois esta área é vegetada e teoricamente não deveria apresentar indícios de disfunções fisiológicas, mas as análises constataram tais alterações no material exposto. Cunha *et al*. (2007) ao estudar os riscos de contaminação de uma área de beneficiamento de calcário, em Vertente do Lério, observaram que os pontos onde houve maiores alterações fisiológicas em *C. verticillaris,* foram

os próximos aos locais de emissão do material particulado, ou a favor da direção predominante dos ventos, demonstrando a influência dos fatores meteorológicos na dispersão de poluentes.

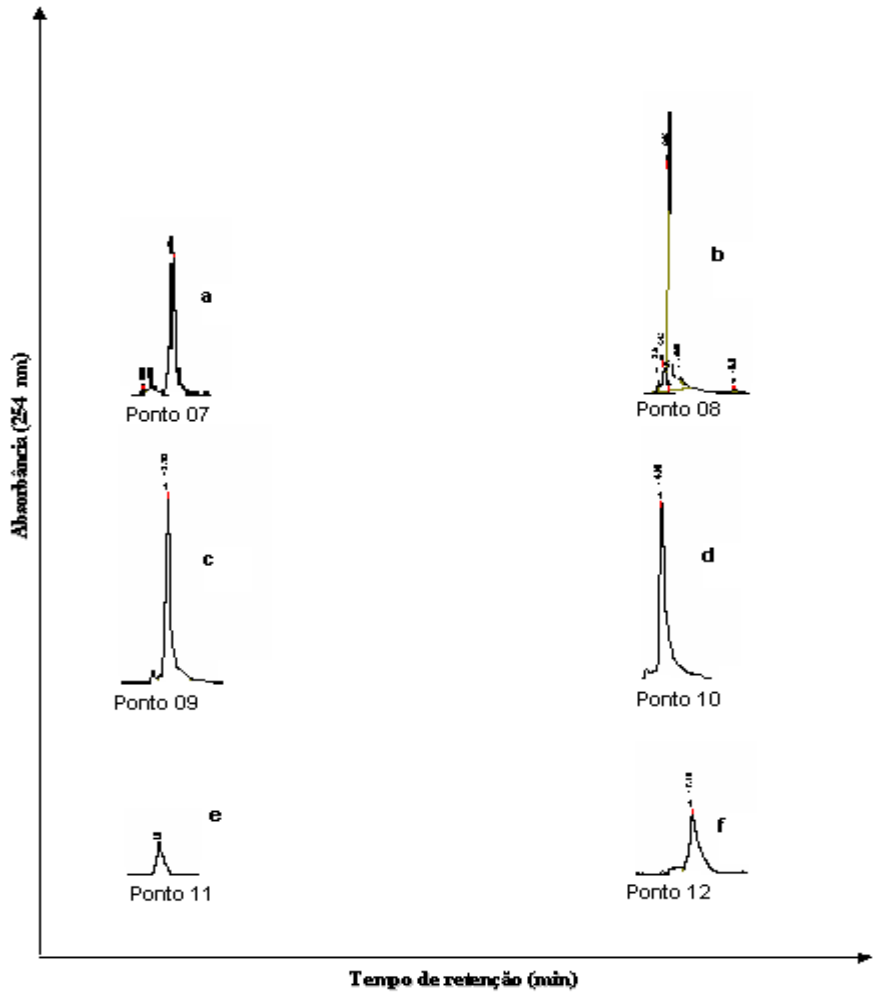

Figura 21: Cromatografia liquida de alta eficiência de *Cladonia verticillaris* após oito meses de exposição em diferentes pontos de ambiente industrial.
Legenda: absorbância a 254 nm (eixo y) e tempo de retenção em minutos (eixo x).

Analisando a CCD dos liquens dos pontos selecionados (figura 22), pode-se observar nos pontos 07 e 08 duas bandas bem definidas referentes ao FUM e ao PRO, respectivamente. Nos pontos 09 e 11 observa-se a ausência do FUM e ocorre apenas uma banda referente ao PRO. No ponto 10 ocorre a presença do FUM e no 12 tem-se a ausência de bandas indicativas de produtos

sintetizados pela espécie. O cromatograma não apresenta bandas referentes a substâncias intermediárias de biossíntese dos ácidos mencionados.

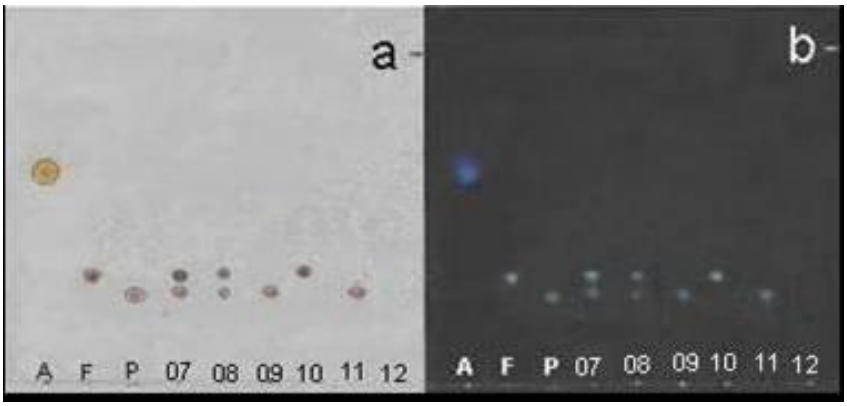

Figura 22: CCD fenóis totais do material após oito meses de exposição ao ambiente industrial. A-padrão atranorina, F-padrão fumarprotocetrárico, P-padrão protocetrárico. 07- Pavimento superior da coagulação, 08- bomba de estireno, 09- base da esfera de armazenamento do estireno, 10- área vegetada próximo a oficina, 11- área vegetada próximo á expedição, 12- área da pirrolidina Ao alto das placas, **a** refere-se ao cromatograma após reação de coloração das bandas; **b** a placa visualizada sob luz UV.

Após oito meses de exposição, todas as amostras parecem muito alteradas, algumas com baixíssimos teores de FUM, outras parecem não conter mais esta substância, apenas com produtos de degradação e/ou intermediarias de sua biossíntese. É possível identificar os pontos 9, 11 e 12 como mais afetados seguidos pelo 8 e 7.

4.2 Análise do material submetido ao estireno e à pirrolidina em condições laboratoriais

Para certificar que os produtos manufaturados e/ou estocados na indústria petroquímica são os responsáveis pela perda da salubridade do ar, em determinados pontos do ambiente industrial, selecionaram-se o estireno e a pirrolidina para estudo em condições laboratoriais.

Ensaios de CCD foram conduzidos com extratos dos fenóis corticais e medulares de *C. verticillaris*, submetidas aos contaminantes por 30 dias.

Na cromatografia referente aos fenóis corticais de *C. verticillaris* submetida ao estireno (figura 23), o FUM e o PRO estiveram presentes em todos os pontos; a ATR não foi detectada em nenhuma amostra. Nos cromatogramas percebe-se o aparecimento de bandas intermediárias da síntese do FUM em todos os pontos, demonstrando desequilíbrio ou interrupção de síntese desta. Estas bandas se evidenciam no material controle após o 10º e 30º dias, ao passo que no experimento com estireno tais bandas se apresentaram logo no início (3º e 5º dias) do período de exposição, demonstrando a sensibilidade do líquen à substância.

A produção do FUM é precedida pela síntese da ATR e do PRO. A presença de bandas com Rf próximo ao do padrão da ATR sugere a presença desta substância nos fenóis medulares de *C. verticillaris* submetida ao estireno (figura 24), demonstrando que a síntese do FUM está sendo prejudicada, já que as bandas referentes a este composto se apresentam menores e mais claras, dando indícios de baixas concentrações desta substância.

Resultado semelhante foi obtido por Mota-Filho *et al.* (2007) ao realizar um biomonitoramento no município de Belo Jardim – PE, detectando nos cromatogramas a presença de bandas intermediárias da biossíntese do FUM, concluindo que a produção dos compostos

principais pode ter sido bloqueada pela ação dos poluentes, já que em suas análises observou-se a presença marcante da ATR (precursora do FUM) e ausência do FUM. Alterações na produção de fenóis pela mesma espécie também foram constatadas por Silva (2002) em ambiente urbano/industrial e, em experimentos sob condições laboratoriais para análise do efeito do acetato de chumbo. Nos seus cromatogramas foram detectadas bandas mal definidas referentes ao FUM, e traços de ATR, demonstrando distúrbios semelhantes ao efeito do estireno no seu metabolismo. Villarouco *et al*. (2007) ao realizar experimentos em laboratório, submetendo *C. verticillaris* ao estireno ou ciclohexano constataram através de CCD, ausência ou bandas mal definidas de FUM no líquen submetido ao estireno; o estudo também identificou o ciclohexano como sendo mais danoso a *C. verticillaris* do que o estireno confirmando a utilidade do líquen na realização de ensaios de biomonitoramento.

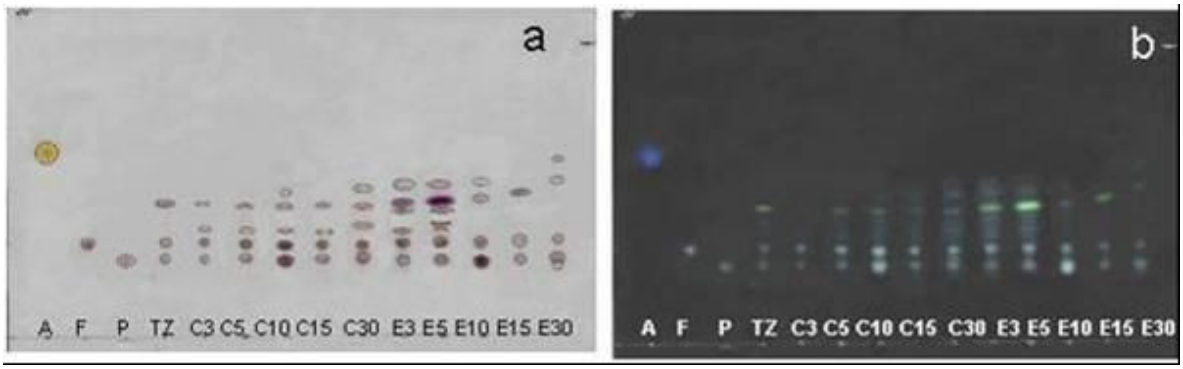

Figura 23: Cromatogramas de extratos de fenóis corticais de *Cladonia verticillaris* submetida ao estireno em condições laboratoriais. Legenda: A-padrão atranorina, F-padrão fumarprotocetrárico, P-padrão protocetrárico, TZ-tempo zero, C3-controle 3 dias, C5-controle 5 dias, C10-controle 10 dias, C15-controle 15 dias, C30-controle 30 dias, E3-estireno 3 dias, E5-estireno 5 dias, E10- estireno 10 dias, E15-estireno 15 dias, E30-estireno 30 dias; **a** refere-se ao cromatograma após reação de coloração das bandas; **b** a placa visualizada sob luz UV.

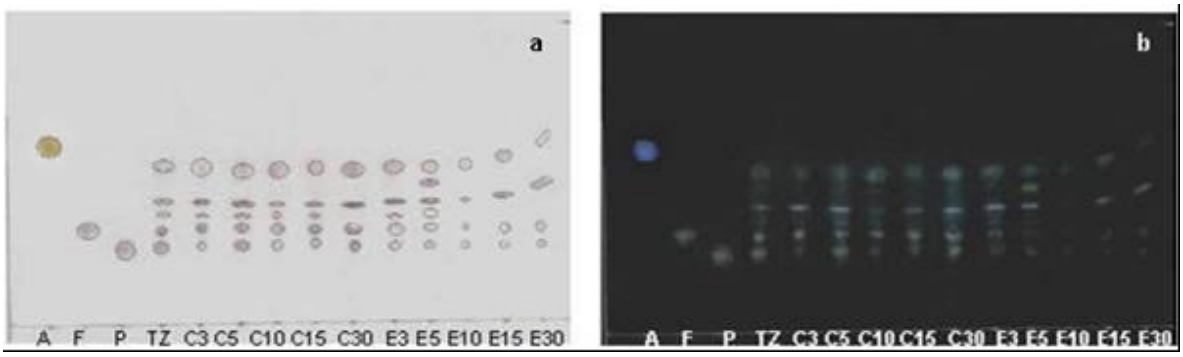

Figura 24: Cromatogramas de extratos de fenóis medulares de *Cladonia verticillaris* submetida ao estireno em condições laboratoriais. Legenda: A-padrão atranorina, F-padrão fumarprotocetrárico, P-padrão protocetrárico, TZ-tempo zero, C3-controle 3 dias, C5-controle 5 dias, C10-controle 10 dias, C15-controle 15 dias, C30-controle 30 dias, E3-estireno 3 dias, E5-estireno 5 dias, E10- estireno 10 dias, E15-estireno 15 dias, E30-estireno 30 dias; **a** refere-se ao cromatograma após reação de coloração das bandas; **b** a placa visualizada sob luz UV.

No experimento realizado com pirrolidina, observa-se no cromatograma dos fenóis corticais (figura 25) a presença do FUM e do PRO apenas no material controle. No material submetido à pirrolidina ocorrem duas bandas referentes aos padrões e outra banda referente a produtos de síntese intermediária, após cinco dias de experimento. No geral, as bandas de substâncias de síntese intermediária não aparecem no cromatograma, diferentemente do que ocorreu no experimento realizado com estireno. Mota-Filho *et al*. (2003) constataram em *Parmotrema praesorediosum* coletada em locais poluídos da cidade do Recife, baixos teores de fenóis corticais quando comparadas ao material proveniente de áreas livres de poluição. Tais resultados dão indícios de que a pirrolidina causa maiores danos do que o estireno, já que o material apresentou diminuição da síntese de substâncias e ausência de compostos após o décimo dia de experimento.

Quanto aos fenóis medulares (figura 26) as bandas referentes aos padrões apresentam-se da mesma forma como descrito para os fenóis corticais: a diferença se dá no maior número de bandas que representam as substâncias intermediárias da síntese do FUM, além da presença de

bandas de ATR nos pontos TZ, C3, C5, C10, C15, C30 E P3. Este fato se deu predominantemente no material controle, diferente do que ocorreu nos fenóis medulares do experimento com estireno, onde bandas de ATR foram observadas em todos os pontos. Estes resultados demonstram novamente que a pirrolidina causou maiores distúrbios fisiológicos em *C. verticillaris*.

Como mencionado, os fenóis participam no mecanismo de defesa do talo liquênico migrando da medula para o córtex. Foi o que Oliveira (2007) constatou no material submetido ao ambiente industrial durante oito meses. No experimento realizado em laboratório com pirrolidina observa-se a concentração de fenóis na medula e não no córtex. Deve-se levar em consideração que o material exposto ao ambiente industrial esteve sujeito as chuvas que ocorreram após quatro meses de montagem do experimento havendo, portanto, a lavagem superficial do talo revigorando seu metabolismo. No experimento com pirrolidina observou-se uma concentração dos fenóis na medula caracterizando fragilidade no líquen. Já a translocação para o córtex foi inibida como forma de proteção de sua porção central.

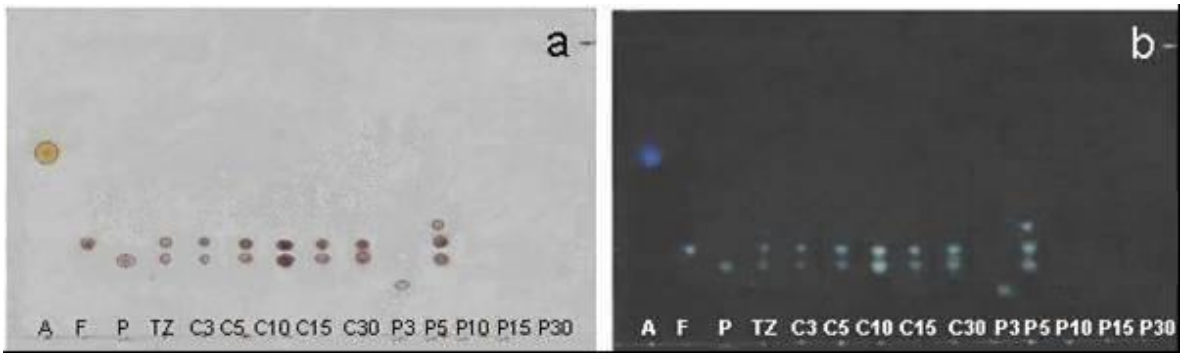

Figura 25: Cromatogramas de extratos de fenóis corticais de *Cladonia verticillaris* submetida à pirrolidina em condições laboratoriais. Legenda: A-padrão atranorina, F-padrão fumarprotocetrárico, P-padrão protocetrárico, TZ-tempo zero, C3-controle 3 dias, C5-controle 5 dias, C10-controle 10 dias, C15-controle 15 dias, C30-controle 30 dias, P3-pirrolidina 3 dias, P5-pirrolidina 5 dias, P10-pirrolidina 10 dias, P15-pirrolidina 15 dias, P30-pirrolidina 30 dias; **a** refere-se ao cromatograma após reação de coloração das bandas; **b** a placa visualizada sob luz UV.

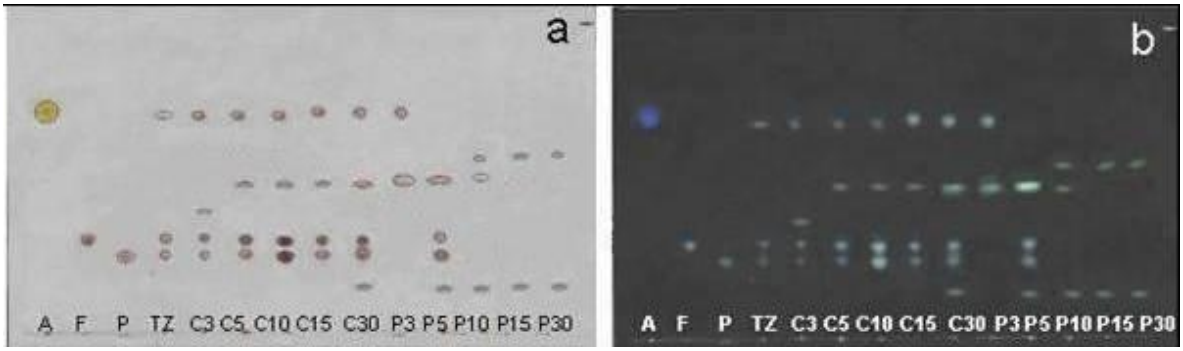

Figura 26: Cromatogramas de extratos de fenóis medulares de *Cladonia verticillaris* submetida à pirrolidina em condições laboratoriais. Legenda: A-padrão atranorina, F-padrão fumarprotocetrárico, P-padrão protocetrárico, TZ-tempo zero, C3-controle 3 dias, C5-controle 5 dias, C10-controle 10 dias, C15-controle 15 dias, C30-controle 30 dias, P3-pirrolidina 3 dias, P5-pirrolidina 5 dias, P10-pirrolidina 10 dias, P15-pirrolidina 15 dias, P30-pirrolidina 30 dias; **a** refere-se ao cromatograma após reação de coloração das bandas; **b** a placa visualizada sob luz UV.

Aspectos como aparência externa dos liquens, cor alterada e aparência quebradiça podem evidenciar a ocorrência e efeito da poluição de um determinado lugar (MAZZITELLI *et al*., 2006). Em relação as alterações morfológicas, foi constatada uma mudança na cor do material submetido ao estireno e à pirrolidina (figura 27). Na figura 27 A observa-se *C. verticillaris* submetida à água deionizada (material controle), na figuta 27 B, o líquen submetido ao estireno e, na figura 27 C o experimento com pirrolidina. Após um mês de experimento, o material submetido à água manteve sua coloração verde clara enquanto que o exposto ao estireno mudou para acinzentado; já o material borrifado com pirrolidina foi o que apresentou maiores alterações passando para a cor marrom.

Resultado semelhante foi encontrado por Le Blanc (1971 *apud* MAZZITELLI *et al*., 2006), que através do estudo de comparação fotográfica, constatou mudanças na coloração do talo de *Parmelia sulcata* para amarelo, rosa ou marrom, dependendo do tempo de exposição ou distância de uma fábrica de alumínio. Brodo (1961 *apud* MAZZITELLI *et al*., 2006) também

notou mudança de cor do material liquênico ao realizar um biomonitoramento ativo em área urbana. Após quatro meses de exposição constatou que *Parmelia caperata* tornou-se branca, e *Lecanora leptyrodes* apresentou descoloração do talo, e seus apotécios ficaram brancos e secos. Freitas (2006) ao realizar um biomonitoramento no complexo portuário e industrial de Suape, detectou mudança da coloração de todas as amostras de *C. verticillaris* após 12 meses de exposição ao ambiente. O material passou de verde claro para tons de marrom, e nos pontos mais críticos apresentou-se seco e quebradiço.

Os danos morfológicos podem trazer prejuízos ao processo de fotossíntese, já que existe uma correspondência entre acumulação de poluentes e morte das células (MAZZITELLI *et al*., 2006).

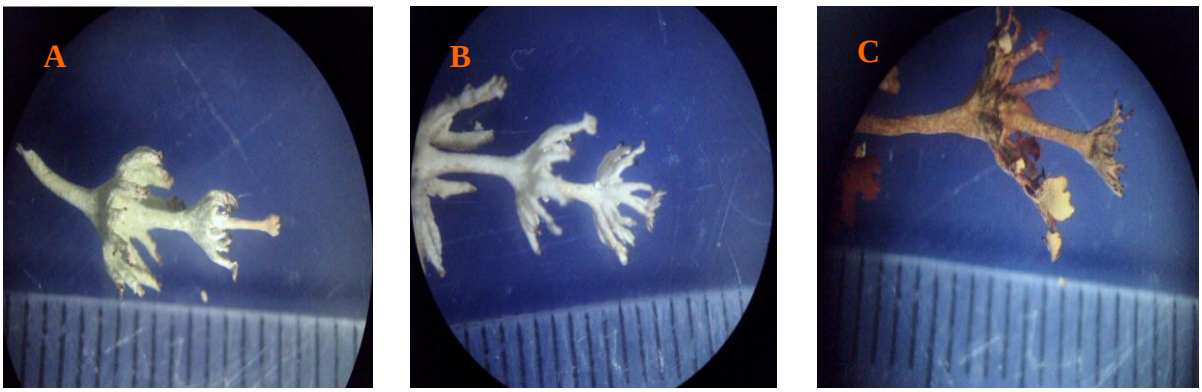

Figura 27: Imagem em lupa estereoscópica de *Cladonia verticillaris* após um mês de exposição, sob condições laboratoriais. A - material submetido à água deionizada (controle), B - material submetido ao estireno, C - material submetido à piorrolidina. Após um mês de experimento em laboratório.

Como outro parâmetro de avaliação dos danos que contaminantes de indústrias petroquímicas podem causar a sistemas vivos, optou-se por quantificar pigmentos fotossintéticos, as clorofilas e feofitinas.

Sabe-se que os poluentes ao penetrarem nas células, destroem as clorofilas, geralmente degradando-as à feofitinas (MOTA-FILHO *et al*., 2003; 2007), quando isto ocorre, a principal reação química da célula, a fotossíntese é imediatamente prejudicada, pois a destruição das clorofilas impede uma eficiente síntese dos carboidratos, que oferecem o esqueleto carbônico formador dos metabólitos secundários, as substâncias liquênicas. Estas, quando cristalizadas no interior do talo, protegem o líquen contra as adversidades climáticas, radiação e contaminantes atmosféricos (NASH, 1996).

Analisando a produção dos pigmentos (clorofilas e feofitinas) de *C. verticillaris* resultante do experimento em laboratório (figura 28), foi detectada no material tempo zero uma concentração de 3,4 g/L de clorofilas totais e 3,37 g/L de feofitinas totais. No material controle houve uma diminuição na síntese dos pigmentos passando para 1,5 g/L de clorofilas e 1,9 g/L de feofitinas. Comportamento semelhante ocorreu no material submetido ao estireno 0,77g/L de clorofilas e 0,96 g/L de feofitinas, além de ser identificado em ambos, níveis de feofitina acima dos de clorofila.

O material submetido à pirrolidina apresentou um comportamento diferenciado quanto à produção de feofitinas. Após um mês de exposição ao poluente, *C. verticillaris* manteve o nível de produção de clorofilas (3,11 g/L), mas apresentou uma produção exacerbada de feofitinas (15,20 g/L). A clorofila é degradada em feofitina a partir da ação de poluentes que promovem a perda de íons de magnésio havendo a acidificação da célula. São considerados casos de danos extremos quando os níveis de feofitina apresentam-se muito acima dos de clorofila (RICHARDSON; PUCKETT, 1973).

Freitas (2006), ao utilizar *C. verticillaris* num biomonitoramento em SUAPE, constatou teores de feofitinas acima dos de clorofilas em experimento instalados na área de contaminação com hidrocarbonetos. Cáceres (1996) também identificou teores de feofitinas acima dos de

clorofilas em *Parmotrema praesoredium* proveniente de alguns pontos do campus da UFPE, e considerou essas áreas como sendo de nível de poluição elevada resultante do tráfego veicular.

Dessa forma, a quantificação de pigmentos (clorofilas e feofitinas) pode ser considerada como mais um parâmetro de avaliação da qualidade do ar nas práticas de biomonitoramento com líquen, já que antes das células serem destruídas elas perdem gradualmente sua atividade e, modificam a produção dos pigmentos. Tal reação permite a detecção precoce de alterações na qualidade do ar, antes que os níveis de poluentes se tornem mais nocivos (KAUPPI, 1980, apud MAZZITELLI *et al*., 2006).

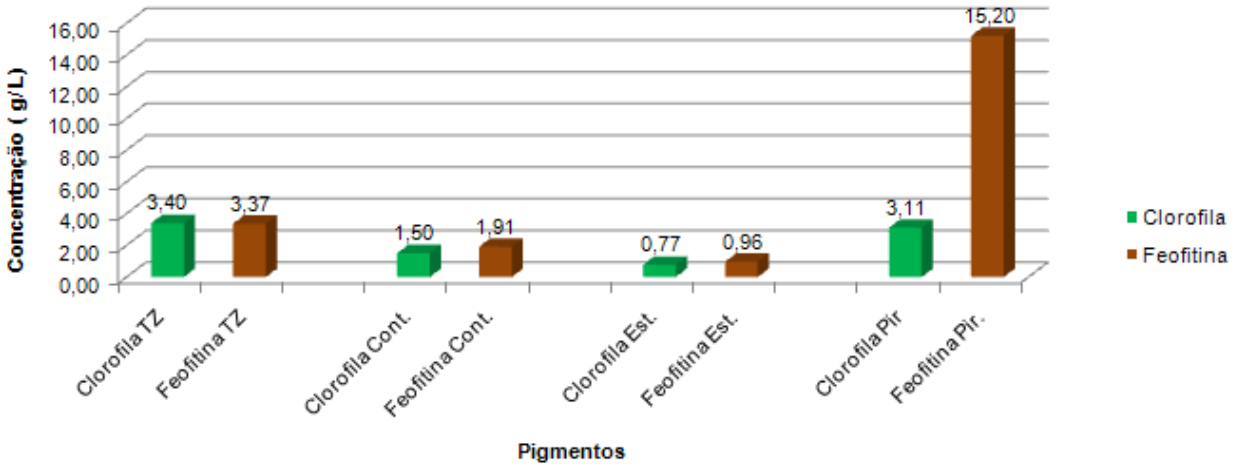

Figura 28: Teor de clorofilas e feofitinas de *Cladonia verticillaris* tempo zero (TZ), após um mês de submissão à água deionizada (Cont), estireno (Est) e pirrolidina (Pir).

Mais uma vez, os resultados apontam a pirrolidina mais prejudicial ao líquen do que o estireno corroborando as análises dos fenóis da espécie.

5 CONCLUSÕES

Através das análises realizadas, *C. verticillaris* demonstrou alterações no desempenho fisiológico no que se refere à produção de fenóis e pigmentos, nos 6 pontos monitorados na industria petroquímica. Os resultados refletem as condições de salubridade do ar, já que o funcionamento do líquen está intimamente ligado à qualidade do ar.

Os experimentos localizados no pavimento superior da coagulação (ponto 07), na bomba de estireno (ponto 08) e na área vegetada utilizada para lazer (ponto 10) apresentaram produção do seu principal composto (FUM) com teores próximos ao do material tempo zero, demonstrando que o líquen não sofreu maiores alterações sendo, portanto, a área considerada salubre.

O material exposto na base da esfera de armazenamento do estireno (ponto 09), na área do viveiro de passarinhos (ponto 11) e na área de armazenamento da pirrolidina (ponto12) não apresentaram teores da FUM, demonstrando colapso após o fim do período de exposição. Tais áreas são consideradas de risco de intoxicação ocupacional.

Nos experimentos realizados em laboratório *C. verticillaris* apresentou distúrbios fisiológicos quando submetida ao estireno e à pirrolidina. No experimento com estireno as disfunções em *C. verticillaris* são identificadas a partir da presença de substâncias de síntese intermediária, mudança de cor de verde claro para cinza e diminuição da síntese de clorofilas e feofitinas, além de uma maior produção de feofitinas do que de clorofilas. No material submetido à pirrolidina observou-se a ausência do FUM e do PRO nas CCDs, mudança da coloração de verde claro para marrom escuro e aumento exacerbado da produção de feofitinas. Desta forma pode-se dizer que a pirrolidina causou maiores danos a *C. verticillaris* e pode ser mais danosa também aos seres vivos. Assim os experimentos de quantificação de pigmentos, além da detecção precoce da ação de contaminantes, corroboram os dados obtidos nas análises de fenóis.

Comparando-se os resultados do material exposto ao ambiente industrial com o líquen submetido aos contaminantes em laboratório, observou-se na CLAE e na CCD do material da

base da esfera de armazenamento do estireno (ponto 09) ausência dos teores de FUM após oito meses de exposição ao ambiente industrial. No material submetido ao estireno em laboratório, a CCD apresentou bandas referentes ao FUM, porém estas apresentaram-se mal definidas demonstrando disfunções do líquen.

Na área de armazenamento da pirrolidina (ponto 12) a CLAE e a CCD demonstraram a ausência do FUM no líquen após oito meses de exposição, a CCD do experimento submetido à pirrolidina em laboratório também apresentou ausência de FUM após um mês de submissão.

A ausência de produção do FUM de *C. verticillaris* submetida ao ambiente industrial e aos produtos químicos específicos em laboratório, demonstra que existe uma correspondência entre os resultados, confirmando o estireno e a pirrolidina como poluentes na indústria. A pirrolidina apresentou-se mais danosa aos liquens, sendo seu local de armazenamento (ponto 12) considerado de maior risco de contaminação ocupacional entre os pontos monitorados.

6 REFERÊNCIAS

AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER-FILHO, L.The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brazil. **Tropical Biology**, v.7, p.55-70, 1993.

CÁCERES, M. E. S. Biomonitoramento ativo e passivo da qualidade do ar atmosférico na cidade do Recife-PE. Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas como trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 77p., 1996.

CARNEIRO, R. M. A. Bioindicadores vegetais de poluição atmosférica: uma contribuição para a saúde da comunidade. Dissertação de mestrado de Enfermagem em saúde pública, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, 146p., 2004.

CRUZ, M. B.; PEREIRA, E.C.; SILVA, N.H.; MOTA-FILHO, F.O.; MARTINS, M. C. B. Monitoramento da ação do formaldeído sobre Cladia aggreagata (líquen), em condições de laboratório. **Caminhos de Geografia**, v.10, n° 29, p.76-87, 2009.

CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the indication of lichen products by standardized thin layer-chromayographic method. **J. Chromatog**, v.72, p.113-125, 1972.

CUNHA, M.H. Biomonitoramento da qualidade do ar em Vertente do Lério – PE, e sua correlação com a ocorrência de doenças pulmonares. Dissertação de mestrado em Gestão e Políticas Ambientais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2005.

CUNHA, M. H.; SILVA , J. M.; MOTA-FILHO, F.O.; PEREIRA, E.C.; SILVA, N. H. *Cladonia Verticillaris* (Raddi) Fr., para diagnostico da salubridade do ar decorrente da extração e beneficiamento de calcário em Vertente do Lério, Pernambuco (Brasil). **Caminhos de Geografia**, v.08, n° 22, p.49-65, 2007.

ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, v.160, p. 27-33, 2001.

ESTRABOU, C. Aplicación de un sistema de monitoreo del aire como política pública para evaluar la evolución de la calidad del aire en la Ciudad de Córdoba. **IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos – Libro de Resúmenes.** Corrientes – Argentina, p.11, 2009.

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental.** EPU. (Ed. Da Universidade de São Paulo). Tradução de Juergen Heinrich Maar. 1980.

FONTANIELLA, B.; LEGAZ, M. E.; PEREIRA, E. C.; VICENTE, C. Bioproducion of lichen phenolics by imobilized lichen cells with emphasis on de rode of epiphitic bactéria. **Journal Hattori Botany Laboratory**, Japão, v.92, n°00, p.245-260, 2002.

FREITAS, F. M. Uso de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. (líquen) como biomonitor da qualidade do ar no Complexo Industrial Portuário de Suape – PE. Dissertação de mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 69p., 2006.

FREITAS, M. C.; REIS, M. A.; MARQUES, A. P.; WOLTERBEEK, H. T. H. Dispersion of chemical elements in an industrial environment studied by monitoring using *Parmelia sulcata.* **J . Radioanal. Nucl. Chem.** v. 244, p.109-113, 2000.

FUGA, A.; SAIKI, M.; MARCELLI, M. P.; SALDIVA, P. H. N. Atmospheric pollutants monitoring by analysis of epiphytic lichens. **Environmental Pollution (Barking)**, v. 151, p.334-340, 2008.

GARTY, J., TOMER, S., LEVIN, T., LEHR, H. Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel. **Enviromental Research,** v.91, p.186-198, 2002.

GUIDOTTI, M., STELLA, D., OWCZAREK, M., DE MARCO, A., DE SIMONE, A. Lichen as policyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. **Journal of Chromatography A**, v.985, p.185-190, 2003.

HALE-JR., M. E. **The Biology of lichens**. 3ed. London. Edward Arnold Pub.,1983.

HAWKSWORTH, D. L. The long-terms effects of air pollutants on lichen communities in Europe and North America. 1990. In: Woodwell, G.M. (ed.) **Patterns and processes of biotic impoverishment.** Cambridge University Press, Cambridge. p. 45-64, 1990.

HAWKSWORTH, D.L. Litmus tests for ecossitem health: the potencial of bioindicador in the monitoring of biodiversity (Sawminathan, M.S. & Jana, S, eds.) **Biodiversity: Implicatios for global food security.** Madras: Macmillan Índia, v.7, p.184-204, 1992.

HILL, R. Chlorophyll. In: Florkin, M.; Stotz, h.(Eds.) **Comprehensive Biochemistry**, v.9, p. 73, 1963.

IPCS-International Programme on Chemical Safety. **International Chemical Safety Card - Styrene.** Disponivel em: <http://www.cdc.gov/niosh/ipcs/icstart.html> Acesso em: 19 de out. 2009 a.

IPCS-International Programme on Chemical Safety. **International Chemical Safety Card - Pyrrolidine.** Disponivel em: <http://www.cdc.gov/niosh/ipcs/icstart.html> Acesso em: 19 de out. 2009 b.

KAUPPI, M. Fluorecense microscopy and microfluorometry for the examination of pollution damage in lichens. **Ann. Bot.Fennici**, 17: 163-173, 1980.

LAWREY, J. D. Biological role of lichen substances. **The Bryologist**, v. 89, n. 2, p. 268-275, 1986.

LE BLANC, F.; RAO, D. N. Effects of pollutants on lichens and bryophytes. In: Mudd, J. B.; Kozlowski, T. T. **Responses of Plants to air Pollution.** London, Academic Press, v.11, p. 237 – 272, 1975.

LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Endogenous inactivators of arginase, L-arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant Physiol.** v.71, p. 300-307, 1983.

LICHEN PHYSIOLOGY PAGE. Disponível em: < http://www.sci.muni.cz/lichens> Acesso em: 09 de abr. 2010.

LLANO, G. A. Economic Use of Lichens. **Smithsonian Institution Publ**., ed.4, p. 385, 1951.

LOPPI , S. Enviromental distribution of mercury and other trace elements in the geothermal area of Bagnore.(Mt. Amiata, Central Italy), **Chemosphere,** v. 45, p. 1333-1336, 2001.

LUCHETA, F.; MARTINS, S. M. A. Liquens foliosos e fruticosos cortícolas do Jardim Botânico de Porto Alegre-Rio Grande do Sul, Brasil. **IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos – Libro de Resúmenes.** Corrientes – Argentina, p.85 , 2009.

MARCELLI, P. M. 2006. Fungos liquenizados in:**Biologia de liquens.** Rio de Janeiro. 619p.

MARKERT, B. Plants as Biomonitors, indicators for Heavy Metals in the Terrestial Environment. **VCH Publishers**. New York. 1993.

MAZZITELLI, S. M. A. M.; MOTA FILHO, F. O.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIRA,R. Utilização dos liquens no biomonitoramento da qualidade do ar. in:**Biologia de liquens**. Rio de Janeiro. 619p, 2006.

MOTA-FILHO, F. O.; SILVA , N. H.; ANDRADE, L. H. C.; PEREIRA, E. C.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Análise de pigmentos de plantas e liquens no Recife como parâmetro de avaliação da poluição ambiental. Revista de Geografia. 2003, 20(2): 43-61.

MOTA-FILHO, F. O.; PEREIRA, E. C.; SILVA, R. A.; XAVIER-FILHO, L. Líquens: Bioindicadores ou Biomonitores?. **Portal Biomonitor**.2005. Disponível em: <http://biomonitor.ist.utl.pt/biomonitor// 2005>. Acesso em: 04 de jan. 2010.

MOTA-FILHO, F.O. Avaliação de contaminantes industriais em elementos bióticos e abióticos
no município de Belo Jardim-PE. Tese de doutorado em Geologia ambiental. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 178p, 2006.

MOTA-FILHO, F.O.; PEREIRA, E.C.; LIMA, E.S.; SILVA, N.H.; FIGUEIREDO, R.C.B. Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *C. verticillaris* (líquen) como biomoniotor. **Química Nova**, v.30, nº 5, p. 1072-1076, 2007.

NASH, T. H. **Lichen Biology**., Cambridge, USA, Cambridge University Press, 1ed., 1996, 303p.

NIEBOER, E.; AHMED, H.M.; PUCKETT, K. J.; RICHARDSON, D.H.S. The heavy metal content of lichens in relation to distance from a nickel smelter in Sudbury, Ontario. **The Lichenologist**, v.5, p. 292-304, 1972.

NOGUEIRA , F.; NASCIMENTO , O. C.; SILVA , E. C.; JUNK, W . Mercúrio total em cabelos: uma contribuição para se avaliar o nível de exposição em Poconé, Mato Grosso, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.13(4), p.601-609, out-dez, 1997.

OLIVEIRA, M. A. G. S. Avaliação da qualidade do ar em ambiente industrial, usando *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.-líquen como biomonitor. Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Geográficas como trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 32p, 2007.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; MEYER, A.; MOREIRA, J.C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. **Human and Environmental Toxicology**, v.19, p. 173-177, 2000.

PEREIRA, E. C., VICENTE, C., LEGAZ, M. E., SILVA, N. H., SILVA, E. F., ANDRADE, L. H. C. Production of lichen metabolites through cell immobilization by Cladonia clathrata Ahtie (Xavier-Filho). **Phyton**, v. 39 (1) : 79-89. 1999.

PILEGAARD, K. Airborne metals and SO2 monitored by epiphytic lichens in an industrial area. **Environ. Pollut**., v.17, p. 81-91, 1978.

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, p. 283-289, 1973.

RIOS, I. Valorização do plástico pós-consumo. Dissertação de Mestrado em gestão de políticas ambientais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 77p., 2005.

RUNDEL, P. W. The ecological role of secondary lichen metabolites. **Biol. System. Ecol**., v. 6, p. 157-170, 1987.

SAIKI, M.; ALVES, E. R.; MARCELLI, M. P. Analysis of lichen species for atmospheric pollution biomonitoring in the Santo André municipality, São Paulo, Brazil, **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 273, n°3, p. 543–547, 2007.

SEAWARD, M. R. D. **Lichen Ecology**. Academic Press, Inc. London. 550p, 1977.

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

SILVA, A. K.; ARAÚJO, E.; PEREIRA, I.; VASCONCELOS, T. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H. Avaliação do índice de pureza atmosférica (IPA) no campus da Universidade Federal de Pernambuco - Brasil, **IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos – Libro de Resúmenes.** Corrientes – Argentina, p.58 , 2009.

SILVA, R. A. *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor padrão da qualidade do ar no Distrito de Jaboatão-PE. Dissertação de mestrado em Gestão e Políticas Ambientais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 146p, 2002.

SOUZA, V. F.; QUELHAS, O. L. G. Avaliação e controle da exposição ocupacional à poeira na indústria da construção. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.8(3), p.801-807, 2003.

UPRETI, D. K., SHUKLA, V. Polycyclic aromatic hydrocarbon(PHA) accumulation in lichen, *Phaeophyscia hispidula* of DehraDun city, Garhmal Himalayas. **Springer Science** v.149, p.1-7, Índia, 2008.

VERNON, L. P. Spectophotometric determination of clorophillis and phaeophytins in plant extracts. **Anal biochen**., v.32, p.1142. 1960.

VILLAROUCO, F. M. O.; FREIRE, E. V. F.; PEREIRA, E. C.; PEREZ, R. E. U. Análise do líquen *Cladonia verticillaris* (RADDI) Fr., em condições de laboratório sob efeito de estireno e ciclohexano. **Interciencia**, abril v.32, n° 004. Asociación Interciencia, Caracas, Venezuela, p.242-246, 2007.

XAVIER-FILHO, L., LEGAZ, M. E., VICENTE, C., PEREIRA, E. C. **Biologia de liquens**. Ed. Âmbito Cultural, Rio de Janeiro. 619p., 2006.

ZAVARIZ, C.; GLINA, D. M. R. Efeitos da Exposição Ocupacional ao Mercúrio em Trabalhadores de uma Indústria de Lâmpadas Elétricas Localizada em Santo Amaro, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 9 (2), p.117-129, abr/jun, 1993.