

METODOLOGIA EXPERIMENTAL PARA AVALIAR OS EFEITOS DE GASES POLUENTES SOBRE FOTOBIONTE LIQUÊNICO

Maria Pilar Rojals Piqué – pilar_pique@hotmail.com *

Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Faculdade de Engenharia Ambiental, Grupo de pesquisa em Biologia Vegetal - CCV

Juliana Barbosa Palhares – palhares@puc-campinas.edu.br *

Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Faculdade de Engenharia Ambiental, Grupo de pesquisa em Saneamento Ambiental - CEATEC

Mariana Aparecida Borguetti Beneventi – maribeneventi@hotmail.com *

Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Faculdade de Engenharia Ambiental, Aluna da graduação.

Lívia Fernanda Mendonça Silva – liviaferms@bol.com.br *

Hádia Christiny Amorim Araújo Feitosa – diachris@ibest.com.br *

Tiago Nora Machado – tnm_1984@yahoo.com.br *

* PUC-Campinas: Rod. D. Pedro I, Km136 – Parque das Universidades 13086-900, Campinas – SP, site: <http://www.puc-campinas.edu.br>

***Resumo:** Para buscar estratégias de motivação e envolvimento dos alunos da Faculdade de Engenharia Ambiental da PUC-Campinas, buscou-se contemplar, neste artigo, a interdisciplinaridade desenvolvendo uma metodologia que envolvesse áreas como Biologia, Química e Matemática. O trabalho apresenta uma abordagem metodológica que visa avaliar os efeitos de gases poluentes sobre fotobionte liquênico, apoiada no desenvolvimento de três níveis didáticos: planejamento, investigação sistematizada e avaliação. Apresenta ainda, opções de soluções e substratos produtores de gases que podem ser testados por meio dos efeitos observados sobre o fotobionte liquênico.*

***Palavras-chave:** Metodologia experimental, Gases poluentes, Líquen, Fotobionte, Poluição atmosférica.*

1 INTRODUÇÃO

Os líquens representam uma associação entre fungos (micobionte), algas e cianobactérias (fotobiontes). Sua arquitetura atende às necessidades dos parceiros, onde a porção autotrófica localiza-se próxima à superfície, enquanto as hifas, heterotróficas, garantem a umidade necessária e ocupam a parte mais interna e inferior do líquen. Os benefícios proporcionados pelo micobionte, incluem proteção contra a dessecação, radiação excessiva, manutenção de uma alta pressão parcial de CO₂ (respiração), fixação e a provisão de nutrientes minerais

retirados do substrato. O fotobionte, proporciona ao fungo, as substâncias orgânicas necessárias ao seu crescimento. Os líquens, nos quais o fotobionte principal ou secundário é uma cianobactéria, são de especial importância devido ao fato de também contribuírem para a adição de nitrogênio em muitas regiões, segundo RAVEN *et al.* (2007).

O fotobionte do líquen pode ocorrer isoladamente na natureza, o que não ocorre com o micobionte, indicando que a associação é muito mais benéfica para o micobionte do que para o fotobionte, o que contradiz com a definição formal de mutualismo simbiótico para tal associação, de acordo com SMITH (1974).

BARON (1999), comenta que os líquens de cores avermelhados, alaranjados e brancos indicam índices praticamente nulos de poluição, enquanto os esverdeados, acinzentados ou verde-azulados, indicam maior concentração de poluição atmosférica.

Atualmente, os líquens estão sendo utilizados para monitorar a qualidade atmosférica em algumas cidades brasileiras, dentre elas Campinas, SP (PIQUÊ *et al.* 2005 e 2006), segundo metodologia proposta por TROPPEMANN (1977).

As medidas e registros efetuados por redes convencionais de monitoramento da qualidade do ar, permitem verificar se normas e limites estabelecidos ou recomendados pela legislação, agências ambientais ou órgãos de promoção da saúde humana estão sendo respeitados. Entretanto, tais medições não permitem conclusões imediatas sobre as conseqüências de poluentes nos seres vivos. Assim, o biomonitoramento pode ser considerado como um método complementar na análise de poluentes, podendo constituir-se em um terceiro sistema de informações, além dos inventários de emissões e de concentrações ambientais de gases, de acordo com KLUMPP (2001).

A acelerada urbanização, com o conseqüente aumento do tráfego, e a expansão das atividades industriais contribuem de forma acentuada para a poluição do ar. Estudos recentes, como GEEBELN e HOFFMANN (2001) e GIORDANI *et al.* (2002), revelam uma redução no número de espécies líquênicas (muito sensíveis) com o aumento das concentrações ambientais de CO₂, SO₂, SO₃, NO_x.

Assim, o planejamento ambiental urbano, além de estruturar a cidade, deve considerar e promover sua capacidade de sustentação ambiental, uma vez que a saúde da população é diretamente afetada na proporção que o meio ambiente urbano é degradado.

O programa de qualidade do ar na cidade de Santo André, SP (PROAR), é um dos muitos exemplos de atuação ambiental na área urbana, que contribui de forma inovadora para a melhoria da qualidade ambiental relacionada às condições do ar que a população respira, bem como para o exercício de cidadania por parte da população, sendo que um dos instrumentos estratégicos utilizados para a implementação de ações para melhoria da qualidade do ar na cidade, é o “Biomonitoramento” que tem como objetivo o monitoramento do ar a partir das plantas, conforme SEMASA (2007).

A Tabela 1 exhibe os efeitos de alguns dos poluentes do ar na saúde humana.

Tabela 1 – Fontes e efeitos de alguns poluentes do ar na saúde humana.

Poluentes	Principais Fontes	Efeitos na saúde
<i>Monóxido de carbono (CO)</i>	Composto gerado nos processos de combustão incompleta de combustíveis fósseis e outros materiais que contenham carbono em sua composição.	Liga-se à hemoglobina, substância do sangue que leva oxigênio às células, formando a carboxi- hemoglobina, e diminui a oxigenação do sangue. Causa tonturas e vertigens. Causa alterações no sistema nervoso central. Pode ser fatal em doses altas, em ambiente fechado. Doentes cardíacos, portadores de angina crônica, são considerados o grupo mais suscetível aos efeitos da exposição ao CO.
<i>Hidrocarbonetos (HC)</i>	Queima incompleta e evaporação dos combustíveis (álcool, gasolina e diesel) e outros produtos voláteis.	Responsáveis pelo aumento da incidência de câncer no pulmão. Provocam irritação nos olhos, nariz, pele e aparelho respiratório.
<i>Dióxido de enxofre (SO₂)</i>	Indústrias e queima de combustíveis que contenham enxofre em sua composição, além de serem gerados em processos biogênicos naturais, tanto no solo quanto na água.	Provoca coriza, catarro e danos irreversíveis aos pulmões. Em doses altas pode ser fatal. Também afeta as plantas e espécies mais sensíveis, e contribui com a destruição do patrimônio histórico, acidificação do solo e corpos d'água.
<i>Óxidos de Nitrogênio (NO_x)</i>	Processos de combustão em geral e veículos.	Podem provocar desconforto respiratório, diminuição da resistência a infecções e alterações celulares.

Fonte: Adaptado de BRAGA *et al.* (2002).

Desde sua implantação, desenvolve-se no Curso de Engenharia Ambiental da PUC Campinas, incentivo na utilização do ambiente primário (urbano) em práticas que promovam uma formação profissional eficiente e eficaz em suas soluções, além de atender às diretrizes CONFEA/ CREA, SESu / MEC e ABENGE, em PIQUÉ *et al.* (2005).

Para isso, faz-se necessário introduzir e aperfeiçoar metodologias que instrumentalizem os alunos para uma atuação compromissada com o equilíbrio entre o desenvolvimento socioeconômico e a manutenção das condições de sustentabilidade do meio ambiente e que ao mesmo tempo, resultem em produção de conhecimento.

É objetivo desta metodologia experimental demonstrar, de modo didático, os efeitos que diferentes concentrações de gases podem causar sobre o fotobionte liquênico.

2 MATERIAIS E METODOLOGIA PROPOSTA

2.1 Materiais utilizados

Os materiais necessários foram distribuídos em: a) biológicos; b) reagentes, sais e/ou soluções; e, c) equipamentos, vidrarias, acessórios e utensílios.

a) Material biológico

- Líquens, de preferência foliáceos.

b) Reagentes, sais, e/ou soluções

- Soluções produtoras de gases em concentrações variadas.

c) Equipamentos, vidrarias, acessórios e utensílios, como apresentado na Figura 1.

- Pipetas de 10ml
- Tubos de Ensaio
- Becker
- Conta-gotas
- Lâminas de vidro para microscopia
- Lamínulas
- Pêra de sucção
- Suporte para tubos
- Etiquetas autocolantes
- Caneta hidrográfica
- Fios de nylon (fino) com 6 cm de comprimento
- Rolo de filme de PVC
- Agulhas de aço
- Tesoura
- Lâmina de aço
- Papel milimetrado
- Microscópio óptico comum



Figura 1 - Vidrarias, acessórios e utensílios

2.2 Procedimento

- 1- Numere os tubos de ensaio de 1 a 6 com uso da caneta hidrográfica, veja a Figura 2.
- 2- Nos tubos de ensaio numerados de 1 a 5, adicione 10 ml da solução doadora de gases nas proporções a serem avaliadas. No tubo de ensaio 6, adicione 10 ml de água destilada, (TUBO CONTROLE), veja a .Figura 3.

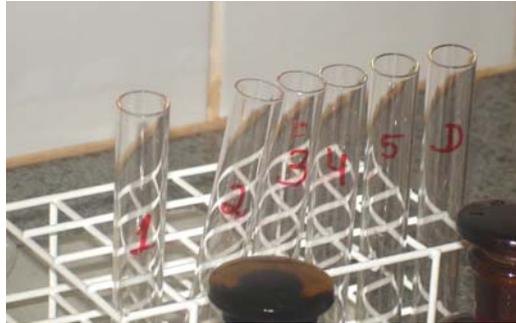


Figura 2 – Numeração dos tubos de ensaio



Figura 3 – Adição da solução doadora nos tubos de ensaio

2.3 Preparo das amostras líquênicas

- 1- Recorte 0,25 cm² de papel milimetrado e use-o como molde para cortar 7 porções de líquen, veja a Figura 4;



Figura 4 – Recorte das porções de líquen

- 2- Fotografe e anote a coloração das amostras líquênicas;
- 3- Fure um dos cantos das 6 amostras recortadas de líquen com uma agulha de aço, veja a Figura 5;



Figura 5 – Uso da agulha de aço para perfurar um dos cantos do líquen contendo 0,25 cm² de área

- 4- Dobre os fios de nylon em forma de “Z”;
- 5- Pendure as amostras de líquen em uma das dobras do “Z” e pendure o conjunto na borda de cada um dos tubos de ensaio, veja a Figura 6;



Figura 6 – Fio de nylon contendo o pedaço de líquen contendo 0,25 cm² de área

- 6- Feche os tubos com filme de PVC, veja a Figura 7;
- 7- Etiquete o experimento anotando a data e deixe-o exposto à luz indireta por um período de 7 dias, veja a Figura 8;



Figura 7 – Líquen dependurado pelo fio e tubo de ensaio fechado com o filme de PVC



Figura 8 – Experimento exposto à luz indireta por um período de n dias

- 8- Com a lâmina de aço, fragmente mecanicamente a 7ª amostra líquênica (Amostra inicial), até transformá-la em pó bem fino,
- 9- Adicione água, cubra com lamínula e observe ao microscópio; e,
- 10- Escolha ao acaso, n campos ópticos, e utilizando a objetiva de 40 X, conte as células do fotobionte, de acordo com a convenção descrita na seqüência, faça as médias e anote no Quadro 1.

A Figura 9 apresenta esquematicamente a preparação líquênica.

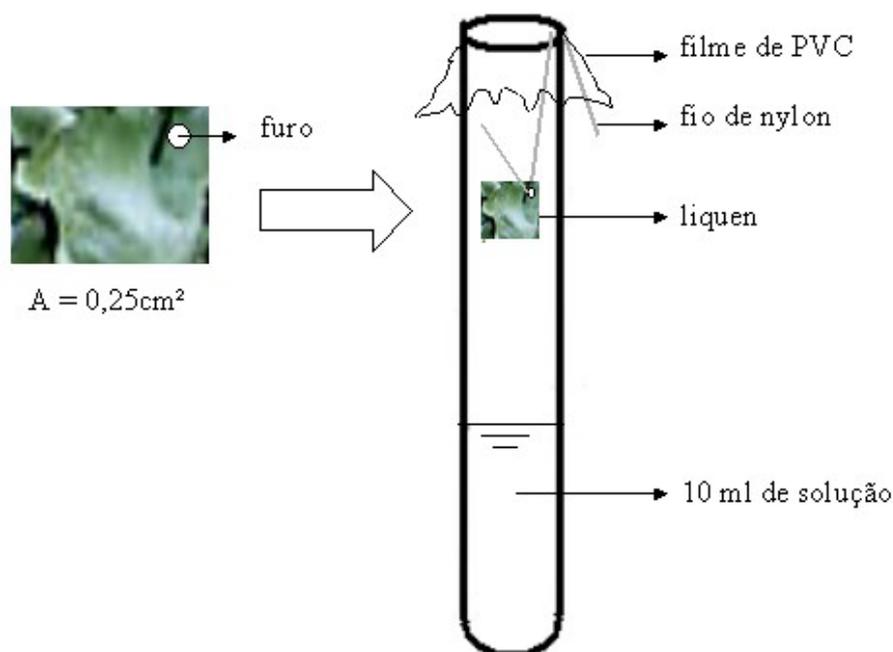


Figura 9 – Desenho esquemático do tubo contendo solução teste e amostra líquênica

2.4 Acompanhamento do experimento

Para cada tubo

- 1- Retire a amostra líquênica de cada um dos tubos, fotografe e anote sua coloração;

- 2- Numere de 1 a 6, lâminas de vidro para microscopia
- 3- Com a lâmina de aço, pulverize mecanicamente cada uma das amostras;
- 4- Adicione água, cubra com lamínula e observe ao microscópio; e,
- 5- Escolha ao acaso, n campos ópticos, e utilizando a objetiva de 40 X, conte as células do fotobionte, de acordo com a convenção abaixo, faça as médias e anote no quadro.

2.5 Convenção adotada para as células do fotobionte

F. I. = Fotobionte Íntegro. Células com cloroplastos colorido ocupando todo o espaço celular.

F. S. = Fotobionte Senescente. Células com cloroplastos coloridos porém enrugados, ocupando parte do espaço celular.

F. M. = Fotobionte Morto. Células com cloroplastos incolores ou de aspecto vazio.

A Figura 10 apresenta desenho esquemático das células do fotobionte visível em campo óptico de objetiva de 40 X, e a Figura 11 mostra a imagem fotografada de um campo óptico de um fotobionte após o período de 7 dias.

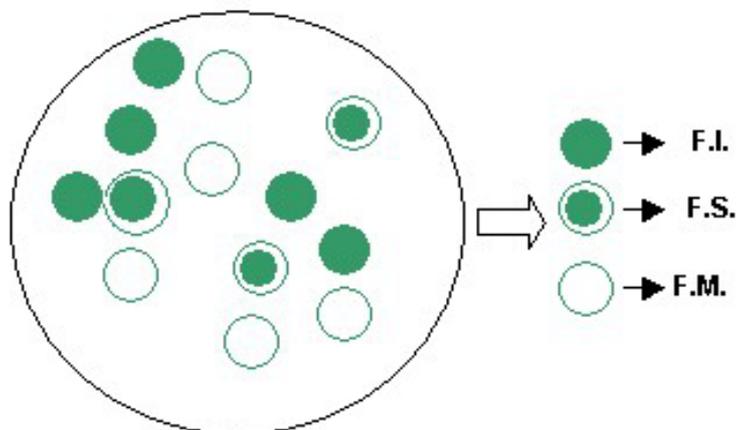


Figura 10 – Desenho esquemático das células do fotobionte visíveis em campo óptico com objetiva de 40 X

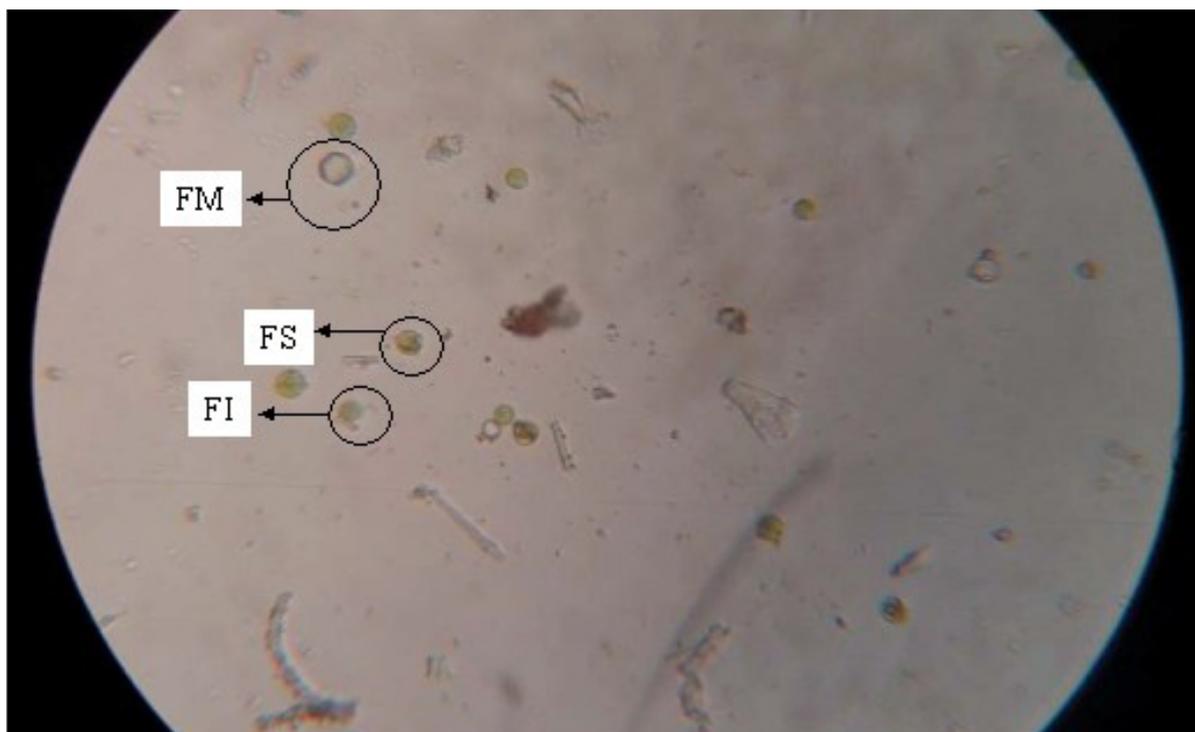


Figura 11 - Imagem fotografada de um campo óptico com objetiva de 40 X

Quadro 1 - Avaliação do fotobionte segundo a convenção e as concentrações testadas.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Amostra inicial
F. I.							
F. S.							
F. M.							

2.6 Aplicações da metodologia

a) Efeitos da ação do SO₂ sobre fotobionte liquênico

Soluções: Metabissulfito de Sódio (Na₂S₂O₅) nas seguintes proporções:

Tubo 1	1:500	0,2 gramas de Na ₂ S ₂ O ₅ / 100 ml de água destilada
Tubo 2	1:1.000	0,1 gramas de Na ₂ S ₂ O ₅ / 100 ml de água destilada
Tubo 3	1:10.000	0,01 gramas de Na ₂ S ₂ O ₅ / 100 ml de água destilada
Tubo 4	1:50.000	0,002 gramas de Na ₂ S ₂ O ₅ / 100 ml de água destilada
Tubo 5	1:100.000	0,001 gramas de Na ₂ S ₂ O ₅ / 100 ml de água destilada
Tubo 6	Controle	10 ml de água destilada

b) Efeitos do CO₂ sobre fotobionte liquênico

Soluções de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de cerveja). Utilize drágeas vendidas comercialmente e pulverizadas em almofariz (por exemplo: 1 drágea inteira, ½ drágea, ¼ drágea).

Soluções de Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) em proporções pré-estabelecidas.

c) Efeitos do HC sobre o fotobionte liquênico

Um hidrocarboneto que pode ser utilizado nesta metodologia é a Naftalina (C₁₀H₈). A naftalina é tóxica a saúde do ser humano. O envenenamento pode ocorrer por meio de ingestão de elevadas doses, inalação e mesmo por contato em pele. Alguns sintomas e sinais presentes pelo envenenamento são: náusea, vômito, febre, necrósia hepática, convulsão, coma, e outros; de acordo com MERCK INDEX (1976).

Outro produto que pode ser testado por ser altamente volátil é: a Cânfora (C₁₀H₁₆O).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios ecotoxicológicos ganharam projeção nacional quando foram introduzidos na nova versão da Resolução 20 do CONAMA, juntamente com a revisão das normas brasileiras para ensaios ecotoxicológicos para o monitoramento e avaliação da qualidade da água.

Assim como a qualidade da água é fundamental para manutenção da vida no planeta, a qualidade do ar é essencial para a sua continuidade.

Dessa forma, a presente metodologia proposta para avaliar os efeitos de gases poluentes sobre o fotobionte liquênico, torna-se interessante por utilizar um substrato estável (líquen) e pelos aspectos biológicos do fotobionte (unicelular, clorofilado e de fácil visualização ao microscópio óptico comum).

Além disso, seu procedimento é de baixo custo e simples.

Esta metodologia foi desenvolvida, testada e avaliada pelos alunos da disciplinas de Biologia da Faculdade de Engenharia Ambiental da PUC-Campinas no período de 2004 a 2007.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARON, G. **Understanding Lichens**. England: The Richmond Publishing Co. Ltda., 1999. p. 41-49.

BRAGA, B. *et al.* **Introdução à Engenharia Ambiental**. São Paulo: Prentice Hall, 2002. p. 305.

GEEBELEN, W. ; HOFFMANN, M. Evaluation of bio-indication methods using epiphytes by correlating with SO₂ – pollution parameters. **Lichenologist**. Elsevier Sciences, v.33, n.2, p. 249-260, mai. 2001.

GIORDANI, P.;BRUNIALTI, G.; ALLETEO, D. Effects of atmospheric pollution on lichen biodiversity (LB) in Mediterranean region (Liguria, Northwest Italy). **Environmental Pollution**, v.118, p. 53-64, 2002. Disponível em: <<http://www.sibi.usp.br/sibi/biblioteca/revista/selecao.php>> Acesso em: 5 mai. 2006.

KLUMPP, A. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. *In* **Indicadores Ambientais: conceitos e aplicações**. Orgs. Nilson B. Maia, Henry Martos e Walter Barrella. São Paulo: EDUC/COMPED/INEP, 2001 p. 285.

PIQUÉ, M.P.R.; PALHARES,J.B.; PINTO,R.A; FEITOSA,H.C.A.A. e SILVA,R.A. Biomonitoramento, instrumento pedagógico a serviço da sustentabilidade urbana. In: **XXXIII Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia**, Campina Grande - Paraíba (Anais – eletrônico), 2005.

PIQUÉ, M.P.R.; PALHARES, J.B.; TREVISAN, V.; FEITOSA, H.C.A.A. e TACIOLI, A. Monitoramento automático (direto) versus biológico (indireto) na avaliação da qualidade do ar. In: **XXXIV Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia**, Passo Fundo – Rio Grande do Sul (Anais – eletrônico), 2006.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. e EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2007.

SEMASA (Serviço Municipal de Saneamento Ambiental de Santo André). **Prefeitura Municipal de Santo André**. Disponível em <<http://www.semasa.sp.gov.br/scripts/display.asp?idmenu=114&idnot=494>> Acesso em: 19 abr. 2007.

SMITH, G.M. **Botânica Cryptogâmica**. v. 1. Algas e Fungos. Lisboa: Fundação Caluste Gulbenkian, 1974. p. 527.

THE MERCK index. **An encyclopedia of chemicals and drugs**. 9th ed. U.S.A.: MERCK & CO., INC, 1976.

TROPPEMAYER, H. **Estudo Biogeográfico de líquens como vegetais indicadores de poluição aérea da cidade de Campinas – SP**. Rio Claro, 1977. Tese (Doutorado) - UNESP – SP.

EXPERIMENTAL METHODOLOGY TO EVALUATE THE EFFECTS OF THE POLLUTANTS GASES ON PHOTOBIONT LICHENIC

Abstract: *To search strategies of motivation and involvement of students from Environmental Engineering College of PUC-Campinas, it was meant to contemplate the interdisciplinarity developing a methodology that involved areas such as Biology, Chemistry and Mathematics. This article presents a methodological approach that aims to evaluate the effects of the pollutants gases on photobiont lichenic, supported by the development of three didactic levels: planning, systematic investigation and evaluation. It also presents, options of solutions and substratum producer of gases that can be tested through the effects observed on photobiont lichenic.*

Key-words: *Experimental methodology, Pollutants gases, Lichen, Photobiont, Atmospheric pollution.*