



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia

FEUP



Ana Mafalda Saraiva Baptista

Comparação do Desempenho de Biomonitores e Monitores Orgânicos Sintéticos, como Acumuladores de Cobre, Chumbo, Estrôncio e Níquel Atmosféricos

ANA MAFALDA SARAIVA BAPTISTA

COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DE BIOMONITORES E
MONITORES ORGÂNICOS SINTÉTICOS, COMO ACUMULADORES
DE COBRE, CHUMBO, ESTRÔNCIO E NÍQUEL ATMOSFÉRICOS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO PARA OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

PORTO
OUTUBRO 2003

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Teresa Vasconcelos desejo exprimir o meu reconhecimento e gratidão, pelo incentivo e disponibilidade sempre demonstrados.

Ao Sr. António Júlio Teixeira de Sousa agradeço o apoio logístico, a iniciativa e disponibilidade demonstradas e os ensinamentos, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

A todas as pessoas do LAQUIPAI e do Departamento de Botânica, agradeço a ajuda prestada e o excelente ambiente de trabalho.

A todos os familiares e amigos o meu bem haja pelo apoio e a paciência.

Preâmbulo

O presente trabalho foi elaborado com vista à obtenção do grau de mestre em Engenharia do Ambiente, concedido pela Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, e foi realizado nos departamentos de Botânica e Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Teve a orientação do Professor Doutor João Paulo Cabral (Faculdade de Ciências) e a co-orientação do Professor Doutor Rui Boaventura (Faculdade de Engenharia).

Este estudo foi efectuado no âmbito do projecto BIOCAL: "Calibration of *in situ* biomonitors for quantification of the atmospheric dispersion of heavy metals", (POCTI/38411/CTA/01), projecto esse em parceria com o Instituto Tecnológico Nuclear (ITN).

Apenas se apresentam os resultados relativos à análise dos quatro elementos quantificados no Porto, bem como os métodos experimentais da responsabilidade da Faculdade de Ciências.

O trabalho experimental realizado no ITN é referido em Material e Métodos.

Resumo

No presente trabalho, pretendeu-se avaliar o desempenho de biomonitores (líquene e casca de árvore) e de monitores orgânicos sintéticos (resinas de troca iónica Chelex 100 na forma sódica e acetato de celulose), como materiais acumuladores de alguns metais (cobre, chumbo, estrôncio e níquel) na atmosfera das cidades do Porto, Viana do Castelo e Sines.

Para isso, realizaram-se exposições de dois meses, em três estações do ano (Inverno, Primavera e Verão), em que o líquene foi exposto de três formas: juntamente com o substrato, destacado do substrato, e moído; a casca de árvore foi exposta quer moída, quer inteira e os monitores orgânicos sintéticos foram expostos na forma granular em que foram adquiridos.

A verificação das condições fisiológicas, das três formas de líquene expostas, durante o tempo de exposição à atmosfera, foi feita semanalmente, através da quantificação de teor em potássio e de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenos totais). Para nenhuma das formas de líquene se detectou uma diminuição destes teores, tendo-se concluído que as condições fisiológicas em que os biomonitores se encontravam no início do estudo, se mantiveram durante os dois meses de exposição.

A comparação do desempenho dos biomonitores moídos com o desempenho dos biomonitores inteiros, tradicionalmente usados em estudos de quantificação de metais, permitiu concluir que os biomonitores moídos não apresentam vantagens em relação aos biomonitores inteiros.

Por outro lado, a exposição de líquene destacado do substrato revelou capacidades de acumulação de chumbo, níquel e estrôncio, comparáveis às obtidas com líquene inteiro, revelando-se uma forma adequada de utilização de líquene, como biomonitor de metais atmosféricos. Esta forma de exposição de líquene apresenta as vantagens de se poder quantificar a área de exposição, com exactidão, e de exigir uma menor quantidade de líquene, do que a usualmente utilizada em estudos de biomonitorização.

No caso dos monitores orgânicos sintéticos, a resina Chelex 100 na forma Na^+ e o acetato de celulose mostraram ser adequados à captação de cobre e níquel, a partir da atmosfera, embora os níveis acumulados, por estes monitores, fossem mais baixos do que os acumulados por

biomonitores. Por outro lado, os níveis acumulados pela resina também foram, geralmente, mais baixos do que os acumulados pelo acetato de celulose.

Considerou-se que o líquene destacado do substrato e o acetato de celulose deveriam ser objecto de estudos mais pormenorizados, no sentido de verificar a sua capacidade para serem, recorrentemente, usados como monitores de metais atmosféricos. Desta forma poder-se-iam obviar, dois dos maiores problemas, com que se debatem os estudos actuais de biomonitorização: redução da variabilidade intrínseca ao organismo vivo e redução do número de organismos que se retiram do ecossistema.

Abstract

This work was aimed at comparing the performance achieved by organic synthetic monitors (cellulose acetate and Chelex 100 resin, in the sodium form), with the performance of biomonitors (lichen and tree bark) as monitors of atmospheric metals (copper, lead, nickel and strontium).

Two-month exposures were performed (during Winter, Spring and Summer) at three different locations: Oporto, Viana do Castelo and Sines. The lichen was exposed attached to the substratum (traditional transplant), detached from the substratum, and ground. The tree bark was exposed as it was collected (traditional) and ground.

Quantification of potassium, chlorophyll, *a* and *b*, and total carotenoids, was performed weekly, throughout the exposure period, in the three forms of lichen. The results showed that none of this physiological responses indicated loss of vitality in any form of exposed lichen.

The performance of the ground biomonitors was not more efficient than the one achieved with the traditional biomonitors.

On the other hand, the detached lichen showed a capacity of accumulating atmospheric metals comparable to the one of the traditional lichen transplant. The advantages of using lichen in this form are the ability to quantify the area of exposure and the fact that a smaller amount of lichen is used.

The organic synthetic monitors proved to be adequate accumulators of copper and nickel, although the levels obtained were lower than those of the biomonitors. Also, the levels accumulated by the resin, were lower than those of cellulose acetate.

The detached lichen and the cellulose acetate should be the subject of further studies, to determine whether their ability to accumulate metals can be used in atmospheric monitoring. This would obviate two current drawbacks of biomonitoring studies: the high natural variability of biological monitors and the lichen's large amount withdrew from the ecosystem.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
PREÂMBULO.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Metais e metais pesados	3
1.2. Toxicidade e Função biológica	5
1.3. Metais na Atmosfera	8
1.3.1. Ciclo natural de metais e influência antropogénica	8
1.3.2. Caracterização atmosférica	9
1.3.3. Quantificação de metais na atmosfera.....	15
1.4. Monitorização Ambiental com Organismos Vivos	16
1.4.1. Variação em respostas ecológicas ao stresse.....	16
1.4.2. Biomonitorização	18
1.4.3. Características de um biomonitor	18
1.4.4. Características gerais dos líquenes	19
1.4.5. Acumulação de metais em líquenes.....	20
1.4.6. Características dos líquenes como biomonitores	21
1.4.7. Utilização de casca de árvores para estudos de monitorização ambiental.....	23
1.4.8. Utilização de biomonitores para estimar poluentes atmosféricos.....	23

1.5. Monitores orgânicos sintéticos	28
1.5.1. Resinas de Troca Iónica	28
1.5.2. Acetato de Celulose	30
1.6. Enquadramento deste estudo.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. Exposição	35
2.1.1. Biomonitores e monitores utilizados.....	35
2.1.2. Local de Amostragem	35
2.1.3. Amostradores	36
2.1.4. Tempo de Exposição.....	38
2.1.5. Recolha e Limpeza dos biomonitores	38
2.1.6. Resina Chelex 100 na forma Na ⁺ e Acetato de Celulose.....	40
2.2. Tratamento e Análise das Amostras	40
2.2.1. Reagentes e Material	40
2.2.2. Tratamento das amostras	41
2.2.3. Digestão	41
2.2.4. Análise	42
2.2.5. Optimização do método de digestão e análise	43
2.3. Controlo de vitalidade do líquene inteiro e moído	45
2.3.1. Parâmetros fisiológicos avaliados: potássio e pigmentos fotossintéticos	45
2.3.2. Exposição dos controlos	46
2.3.3. Análise de pigmentos fotossintéticos	46
2.3.4. Optimização do método de extracção dos pigmentos fotossintéticos	47
2.3.5. Análise de potássio	49
3. RESULTADOS.....	51
3.1. Resultados quantitativos da exposição atmosférica.....	53
3.2. Resultados obtidos com o controlo de vitalidade	66
4. DISCUSSÃO	79

4.1. Avaliação do desempenho dos monitores como acumuladores de elementos atmosféricos.....	81
4.2. Avaliação do controlo de vitalidade do líquene.....	86
5. CONCLUSÃO	89
BIBLIOGRAFIA	93

1. INTRODUÇÃO



A importância de se monitorizar a qualidade do ar atmosférico é hoje mundialmente reconhecida. A poluição atmosférica, de origem antropogénica, aumentou drasticamente como resultado da industrialização a nível mundial, durante os séculos XIX e XX. Devido ao permanente desenvolvimento de indústrias e à utilização crescente de produtos químicos para fins variados, a poluição da biosfera em geral, e da atmosfera em particular, tem vindo a agravar-se. O Homem, além de principal responsável, é também uma das principais vítimas, pois alguns dos poluentes, onde se incluem os metais pesados, são responsáveis por problemas de saúde graves e complexos.

Nos últimos 30 anos, os controlos ambientais na União Europeia contribuíram para melhorias consideráveis em numerosos domínios, entre os quais se destaca a diminuição significativa das emissões industriais de substâncias e elementos tóxicos como o chumbo, o mercúrio e o dióxido de enxofre, embora as diminuições registadas para os óxidos de azoto e amónia não tenham sido tão grandes (Comissão Europeia, 2002).

A qualidade do ar tem sido uma das áreas em que a União Europeia se encontra mais activa. Integrados na política ambiental que vem sendo desenvolvida pela União Europeia, o lançamento do sexto programa de acção no domínio do ambiente: "Ambiente 2010, o nosso futuro, a nossa escolha" (Decisão nº 2002/1600/CE) e a ratificação do "Protocolo de Quioto" sobre as alterações climáticas (Decisão nº 2002/358/CE), constituem os dois últimos passos mais importantes na política ambiental dos Estados Membros.

1.1. Metais e metais pesados

Em estudos de poluição atmosférica é comum encontrar-se o termo "metal pesado". No entanto, este é um termo sem uma definição rigorosa, que não corresponde a qualquer grupo definido em termos químicos, e tem sido usado de forma diferente por diferentes autores (Nash, 1996).

Duffus (2001) refere que foi Bjerrum, em 1936, que pela primeira vez usou o termo "metais pesados" num contexto químico, aplicando-o a elementos com densidade superior a 7 g cm^{-3} . Desde essa altura, numerosos autores propuseram outros tantos significados para o termo e para os elementos que ele descreve. Muitas das caracterizações propostas basearam-se na densidade, gravidade específica, peso, ou massa atómica, e número atómico. Outras, basearam-se na sua toxicidade ou eco-toxicidade. Mas, apesar de muitos autores considerarem o termo impreciso, o facto é que ele se manteve na literatura e regulamentações ambientais (Duffus, 2001).

A esta situação acresce que, o termo "metal pesado", ainda não foi incluído no "Compêndio de Terminologia Química" da International Union of Pure and Applied Chemistry (McNaught e Wilkinson, 1997).

Segundo Duffus (2001), a biodisponibilidade é a chave para avaliar o potencial toxicológico dos metais e seus compostos, pois a biodisponibilidade depende tanto de parâmetros biológicos como de propriedades físico-químicas dos iões ou compostos. Por sua vez, essas propriedades físico-químicas, dependem da estrutura atômica de cada elemento, estrutura essa que é descrita pela tabela periódica. Assim, a melhor opção será uma classificação baseada na tabela periódica dos elementos, ou numa subdivisão sua. Uma das possibilidades foi sugerida por Nieboer e Richardson.

Nieboer e Richardson (1980) consideraram que em vez da designação generalista "metal pesado", seria mais conveniente considerar grupos, com função química e biológica estabelecida, e propuseram a utilização da seguinte divisão: metais da classe A (duros), metais da classe B (suaves) e metais de Fronteira. Esta classificação tem por base a acidez de Lewis e indica a forma de ligação nos complexos metálicos. As designações adoptadas determinam a possibilidade da formação de complexos, logo, dão uma ideia da sua toxicidade.

Na figura 1.1. pode ver-se a utilização proposta por Nieboer e Richardson (1980).

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="background-color: #cccccc; width: 20px; height: 15px; margin-right: 5px;"></div> Classe A <div style="width: 20px; height: 15px; margin-left: 20px;"></div> Classe B <div style="background-color: #cccccc; border: 1px dotted black; width: 20px; height: 15px; margin-left: 20px;"></div> Fronteira </div>																					
H																	He				
Li	Be															B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg															Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe(III) Fe(II)	Co	Ni	Cu(II) Cu(I)	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr				
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe				
Cs	Ba	*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb(IV) Pb(II)	Bi	Po	At	Rn				
Fr	Ra	#	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt													
* lantanídeos	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu						
#actinídeos	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr						

Figura 1.1. Tabela periódica mostrando a divisão em três classes de metais (adaptado de Duffus, 2001).

Os elementos da classe A ligam-se, preferencialmente, a ácidos carboxílicos, ou a outros doadores de oxigénio, e incluem todos os macronutrientes catiónicos de plantas terrestres (por exemplo, potássio, magnésio e cálcio). Os elementos da classe B ligam-se aos mesmos grupos, fracamente, e ligam-se fortemente a grupos com azoto e enxofre (por exemplo, prata, ouro e mercúrio). Os metais de Fronteira têm uma preferência de ligação intermédia entre as duas anteriores. Podem ligar-se a qualquer um dos grupos descritos anteriormente, sendo a afinidade da ligação dependente do metal em questão e da sua concentração (por exemplo, cobre, níquel e chumbo) (Nieboer e Richardson, 1980).

Geralmente os iões da classe B são tóxicos para os organismos, devido à sua capacidade de se ligarem aos centros de nitrogénio e enxofre de enzimas e aminoácidos. Na classe de Fronteira encontram-se muitos dos micronutrientes essenciais. No entanto, alguns destes elementos podem tornar-se tóxicos se a sua concentração exceder um determinado valor, passando a actuar como os metais da classe B, inibindo moléculas essenciais ao funcionamento da célula (Nieboer e Richardson, 1980). Com base em experiências de competição, Nieboer e Richardson (1980) estabeleceram uma sequência de afinidade, para os vários locais de troca iónica: metais monovalentes da classe A < metais divalentes da classe A < metais divalentes da classe de Fronteira < metais divalentes da classe B.

Mesmo que o termo “metal pesado” se torne obsoleto, por falta de base científica coerente, haverá sempre um problema associado com o uso comum do termo “metal”, pois geralmente refere-se a um ião e a todos os seus compostos. Isto poderá sugerir que ambos têm as mesmas propriedades físico-químicas, biológicas e toxicológicas, o que se sabe não ser verdade (Duffus, 2001).

1.2. Toxicidade e Função biológica

Os estudos actuais salientam a preocupação com metais, por exposição residencial ou ocupacional. Em quantidades baixas, estes elementos são comuns no meio ambiente e na nossa dieta, mas em doses elevadas podem causar toxicidade aguda ou crónica. Isto pode levar a lesões no sistema nervoso central, diminuição dos níveis de energia e lesões em órgãos vitais. Uma exposição de longo termo pode resultar numa degeneração progressiva física, muscular e neurológica, que mimetize os sintomas das doenças de Alzheimer, Parkinson, Distrofia Muscular ou Esclerose Múltipla. As alergias são também comuns e o contacto repetido e prolongado com alguns compostos de metais pesados pode mesmo provocar o cancro, como está provado para o caso do arsénio (Hu, 2002).

Por outro lado, existem metais xenobióticos, como é o caso do chumbo e mercúrio, sem qualquer função biológica conhecida, quer para o ser humano quer para outros animais, e que se tornam tóxicos mesmo a níveis vestigiais (Hu, 2002).

O cádmio, chumbo, mercúrio, níquel, cobre, ferro, manganésio e zinco são exemplos de elementos que se acumulam na cadeia trófica e, uma vez absorvidos pelos tecidos do corpo, torna-se muito difícil excretá-los (Bermen, 1980).

As principais funções de cada um destes elementos, e as patologias mais frequentemente a eles associadas, encontram-se sumarizadas na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Efeitos e funções de alguns elementos na saúde humana (adaptado de Bermen, 1980 e de Silva e Williams, 1993).

	Efeito	Função biológica
Cd	Irritação das vias respiratórias, dores de cabeça, vômitos, cãimbras musculares, alterações do fígado e rins, anemia; é carcinogénico e mutagénico	Compete com o zinco pelos mesmos locais de ligação; estimula a síntese de metalotieninas; presente em proteínas do rim; constituinte de metalo-enzimas, tais como a adenosina trifosfatase e carboxipeptidase
Hg	Intoxicação por inalação, pneumonites, letargia, febre, tosse, diarreia, tremores, erupções da pele, alucinações	Constituinte de metalo-enzimas, tais como a adenosina trifosfatase e carboxipeptidase
Pb	Distúrbios no sistema nervoso, cólicas, paralias, alterações no comportamento, convulsões, morte	Reage com grupos sulfidrílo; substitui o zinco na desidratase do ácido δ -aminolaevulínico; constituinte de metalo-enzimas, tais como a adenosina trifosfatase e carboxipeptidase

Tabela 1.1. (continuação)

Ni	Dermatites, vertigens, dores de cabeça, náuseas, taquicardia, insuficiências pulmonares; é carcinogénico	Presente no soro sanguíneo; componente da vitamina B; envolvido na síntese da hemoglobina; constituinte de metalo-enzimas
Fe	Náuseas, vômitos, irritação gasterointestinal, siderose do pulmão	Constituinte da hemoglobina e enzimas da cadeia respiratória
Mn	Distúrbios na actividade reprodutora, astenia, dores musculares, distúrbios no sono, dificuldade em andar, tremores, febre, doenças pulmonares	Essencial para o crescimento, formação óssea e função reprodutora normal
Zn	Vômitos, dores de cabeça, hiperglicemia, pneumonites	Influencia a velocidade de crescimento e desenvolvimento de órgãos reprodutores; intervém no metabolismo de RNA e DNA, síntese de proteínas, vitaminas, carboidratos e lípidos

Diversas entidades, tais como, "Agency for Toxic Substances and Disease Registry", "Environmental Protection Agency" e "Occupational Safety and Health Agency" têm realizado estudos epidemiológicos, com o objectivo de compreender a relação entre exposição a estes elementos e efeitos adversos na saúde humana. Essa informação é posteriormente utilizada na elaboração de regulamentação sobre emissões de poluentes específicos para a atmosfera.

As vias de entrada destes elementos no organismo são múltiplas e de contacto diário designadamente, por inalação, ingestão e absorção cutânea. A absorção cutânea, especialmente em meios industriais, é a causa mais apontada para a exposição de adultos, enquanto que nas crianças a ingestão assume esse papel (Hu, 2002).

A figura 1.2. pretende representar, de forma simplificada, as vias de exposição dos seres humanos aos metais pesados.

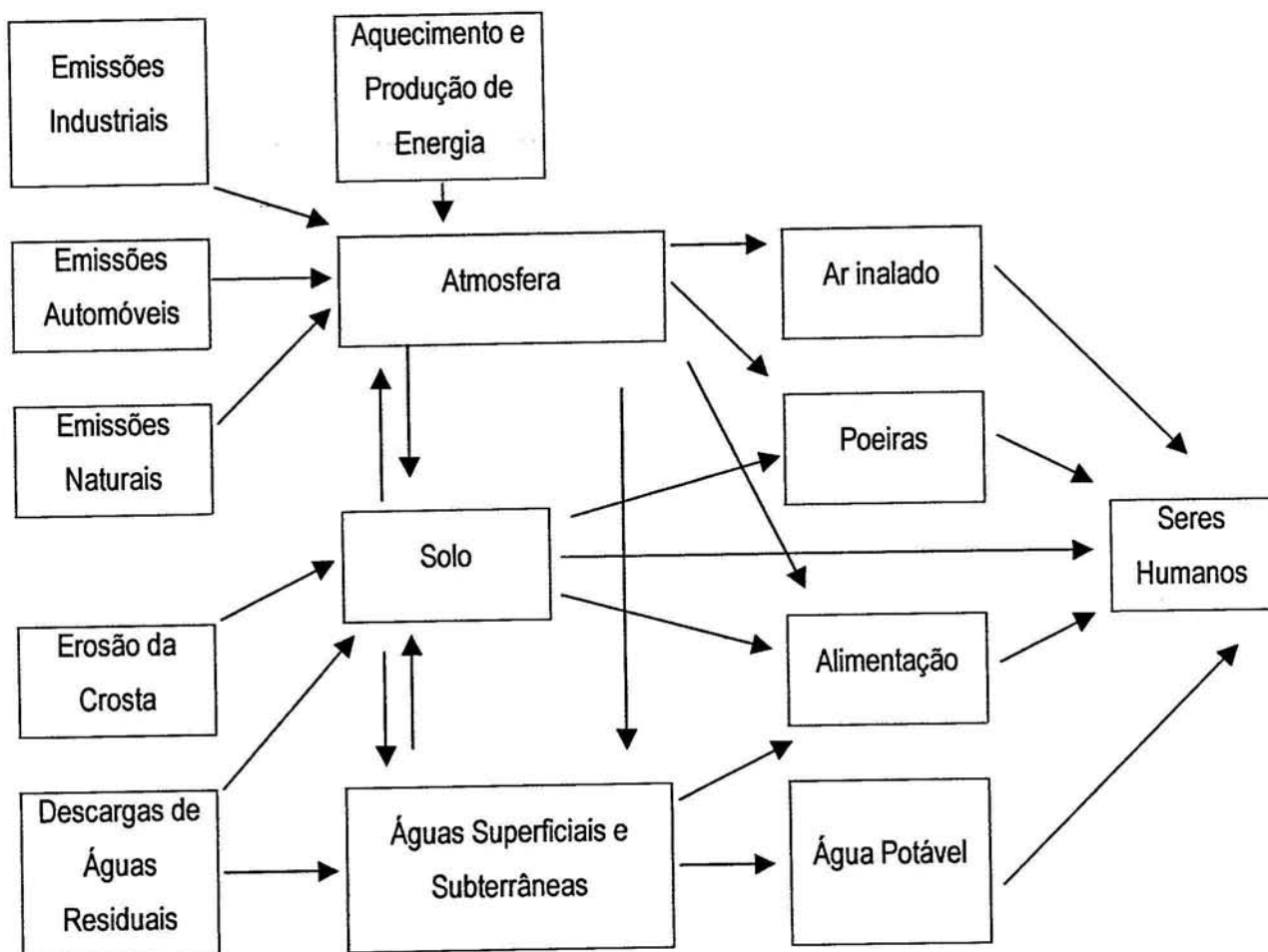


Figura 1.2. Vias de exposição humana aos metais pesados (adaptado de Comissão Europeia, 1997).

1.3. Metais na Atmosfera

1.3.1. Ciclo natural de metais e influência antropogénica

Antes da intervenção humana, era possível observar um ciclo natural de metais na atmosfera diferente do que conhecemos hoje.

Nriagu (1989) identificou várias possíveis fontes de metais na atmosfera. Os metais entram na atmosfera sob a forma de partículas sólidas de diferentes tamanhos. O mercúrio é uma exceção, pois entra na atmosfera, a partir de fontes naturais, essencialmente sob a forma de

vapor. Dependendo do tamanho da partícula e da altura da fonte emissora, os metais podem ser transportados através de certas distâncias, criando níveis de concentrações.

Segundo Nriagu (1989), o vento a soprar à superfície do solo (juntamente com a actividade vulcânica), é a principal fonte natural de cádmio e chumbo na atmosfera. Como o vulcanismo não é típico da Europa, o solo torna-se praticamente a fonte exclusiva.

Sobre o oceano, a principal fonte natural de metais para a atmosfera é a formação de partículas salinas no mar. As partículas salinas podem facilmente ser enriquecidas em metais, relativamente aos macrocomponentes, uma vez que são acumulados numa microcamada superficial, na interface oceano-atmosfera (Brimblecombe, 1986). Isto resulta na intensificação do influxo de metais, para a atmosfera, a partir do oceano.

A alteração do ciclo atmosférico global de metais originou um incremento destes elementos nas camadas superficiais do oceano e da terra, intensificando, conseqüentemente, a emissão da superfície do mar, e do horizonte O do solo, devido à pobre capacidade de migração que estes elementos apresentam (Nriagu, 1989). Com a intervenção humana, é possível identificar muitas outras fontes de emissão de metais para a atmosfera, relacionadas essencialmente com processos industriais e meios de transporte. Podem também identificar-se fontes de emissão adicionais, que concorrem para a poluição de uma dada região: um acréscimo de metais de áreas previamente contaminadas, dentro da mesma região; o transporte de metais de longa distância e, no caso do mercúrio, a concentração natural na atmosfera terrestre. Presentemente, é impossível separar a componente natural de concentração e deposição de metais, da componente antropogénica (Nriagu, 1989).

1.3.2. Caracterização atmosférica

Os metais entram na atmosfera através de emissões antropogénicas, a partir de fontes naturais e devido a emissões de elementos previamente depositados (re-emissões) (Ilyin *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, numerosos estudos contribuíram para o conhecimento das concentrações de metais na atmosfera. Estas indicações são tanto mais importantes pelo facto de, actualmente, a legislação em vigor no nosso país, apenas definir o valor máximo admissível para o chumbo, em atmosfera aberta, fixado em $2 \mu\text{g m}^{-3}$ – concentração média anual - (Portaria nº 399/97, de 18 de Junho).

No entanto, o relatório da União Europeia do "Working Group on Lead Atmospheric Pollution" concluiu que, o valor actualmente legislado se destina, apenas, a proteger a saúde humana (tal como acontece para a maioria das substâncias consideradas tóxicas), uma vez que o conhecimento actual não permite a adopção de limites máximos, que visem a protecção do meio ambiente. Os autores do estudo propuseram que se adoptasse, como valor guia, o proposto pela Organização Mundial de Saúde ($0.5 \mu\text{g m}^{-3}$), ou os valores propostos por Kühling e Peters (1994), que estimaram uma concentração de 0.05 a $0.1 \mu\text{g m}^{-3}$ para áreas rurais (limpas), e que estipularam uma concentração natural de chumbo na atmosfera de 0.6 ng m^{-3} (Comissão Europeia, 1997).

No que diz respeito a emissões atmosféricas de metais, desde 1996 que a Directiva 1996/62/CE (transposta para direito interno pelo Decreto-Lei nº 276/99 de 23 de Julho) prevê a elaboração de Directivas Filhas, que legislem as concentrações atmosféricas de níquel, cádmio, arsénio e mercúrio, uma vez que a Directiva 1999/30/CE (transposta para direito interno pelo Decreto-Lei nº 111/2002 de 16 de Abril) já apresenta valores-limite para chumbo. O relatório da União Europeia "Economic Evaluation of Air Quality Targets for Heavy Metals" teve como principal objectivo, a identificação e estimativa dos custos e benefícios de propor limites para as concentrações de arsénio, cádmio e níquel, na atmosfera. Nesse relatório salientou-se a necessidade de realizar um estudo semelhante para o caso do mercúrio, o que não foi possível, devido à falta de dados. Salientou-se, também, a dificuldade de realização do estudo, devido à grande dispersão de dados de algumas empresas. Para estes investigadores, os custos de implementar limites máximos admissíveis para estes metais, na conjuntura actual, são superiores aos benefícios que se obteriam, neste caso quantificados com base na redução da percentagem de doentes cancerosos. Paralelamente, também concluíram que a implementação destes limites traria benefícios ambientais secundários na melhoria da qualidade do ar. Contudo, houve dificuldade em definir indicadores que permitissem quantificar essa melhoria (Comissão Europeia, 2001).

De notar que as conclusões apresentadas no estudo são controversas, uma vez que a quantificação dos benefícios é muito subjectiva.

Um estudo realizado pelo "Meteorological Synthesizing Centre – East", inserido no "Co-operative programme for monitoring and evaluation of long-range transmissions of air pollutants in Europe" permitiu avaliar a contaminação que se verifica actualmente no continente europeu, no que diz respeito ao chumbo, cádmio e mercúrio, bem como obter informação acerca da última década.

Para se avaliar as emissões totais, começou-se por estimar a concentração de chumbo, cádmio e mercúrio, na atmosfera, a partir de fontes quasi-naturais (emissão natural e re-emissão), considerando o continente e o oceano como dois sistemas separados, em condições estacionárias. Na tabela 1.2. podem ver-se as estimativas obtidas.

Tabela 1.2. Estimativa das emissões de chumbo, cádmio e mercúrio de fontes quasi-naturais, no continente Europeu (adaptado de Ilyin *et al.*, 2001).

Fonte / Fluxo	Metal		
	Pb	Cd	Hg
Intensidade específica em terra ($\text{g km}^{-2} \text{ano}^{-1}$)	330	18	0 – 40
Intensidade específica no mar ($\text{g km}^{-2} \text{ano}^{-1}$)	240	12	0.4

A avaliação das emissões antropogénicas foi feita tendo por base os dados oficiais fornecidos pelos vários países. Quando tal não foi possível utilizaram-se previsões de estudos publicados anteriormente. A partir desses valores, foi possível traçar a distribuição espacial destes elementos no continente europeu. O chumbo apresentou uma distribuição uniforme, essencialmente devido às emissões provenientes da gasolina e gasóleo, abundantes em todos os países considerados. As emissões de cádmio consideraram-se primariamente ligadas à indústria metalúrgica não-ferrosa (43%) e à combustão de fuel (31%). A distribuição espacial de emissões de mercúrio reflectiu essencialmente o consumo de carvão, nas diferentes regiões consideradas (Ilyin *et al.*, 2001).

Segundo a “Segunda Avaliação do Ambiente na Europa”, as emissões de cádmio e chumbo actualmente registadas são cerca de 65% inferiores aos níveis máximos de 1965 (Comissão Europeia, 1998).

De 1990 a 2001, a redução de emissões antropogénicas na Europa, foi de 3.3 vezes para o chumbo, de 1.8 vezes para o Cádmio e de 2.0 vezes para o mercúrio (Ilyin *et al.*, 2003).

Embora a tendência seja no sentido de uma cada vez menor emissão de metais, a sua redução não tem sido continuada. Swietlicki *et al.* (1996) compararam as concentrações de metais pesados medidos em aerossóis de estações de monitorização (Suécia, Dinamarca, Finlândia, Noruega e República Checa), com as concentrações estimadas pelo modelo de dispersão meteorológica “Transporte Euleriano de Metais Pesados”. Os dados deste estudo, cobrem o período de 1985 a 1994, e permitiram concluir que, durante o período de tempo em estudo, quatro fontes contribuíram para a entrada de metais na atmosfera: 1) solo, 2) influência marinha,

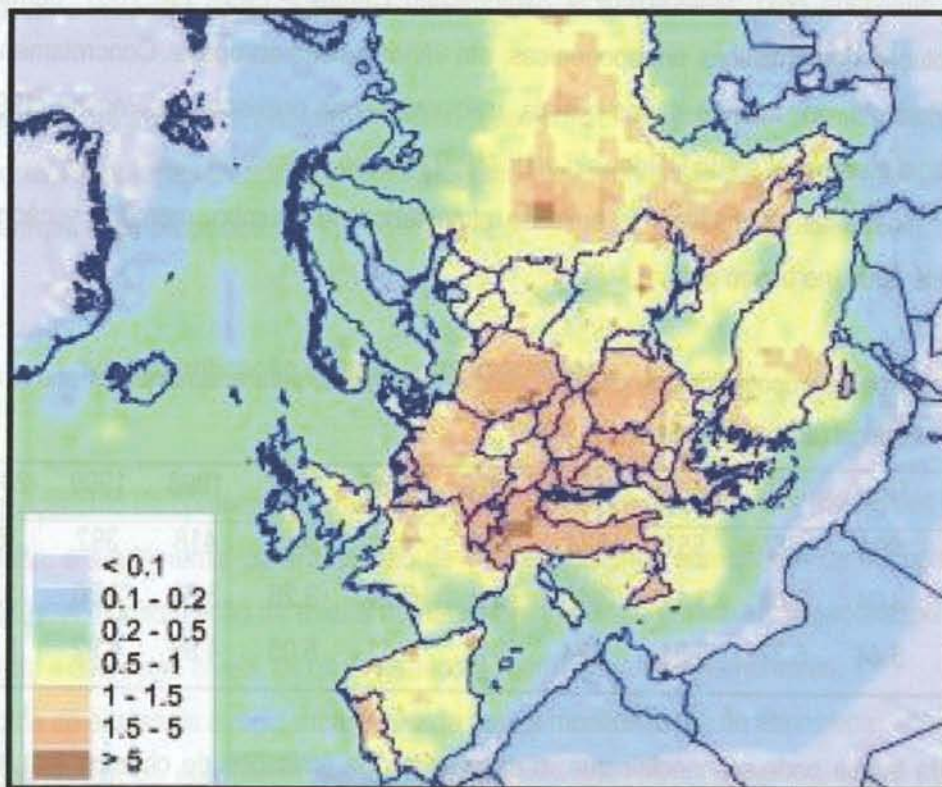
3) processos de combustão em geral e 4) processos de combustão de óleos. Os autores verificaram uma diminuição nos valores de elementos oriundos dos processos de combustão (enxofre, crómio, cobre, zinco, arsénio, cádmio, bário e chumbo). As concentrações destes elementos apresentaram um pico em 1987-90, diminuindo, depois, para valores comparáveis aos de 1985-86, sendo o crómio e o chumbo os que apresentaram a maior queda. A diminuição das concentrações dos elementos típicos da combustão de óleos (vanádio e níquel) foi menos pronunciada e o seu máximo só se encontra no período de 1991-92.

Contrastando com a redução de emissões antropogénicas, de 1990 a 2001, as reduções dos níveis de deposição não foram tão elevadas, situando-se em 2.7 vezes para o chumbo e 1.5 vezes para cádmio e mercúrio (Ilyin *et al.*, 2003).

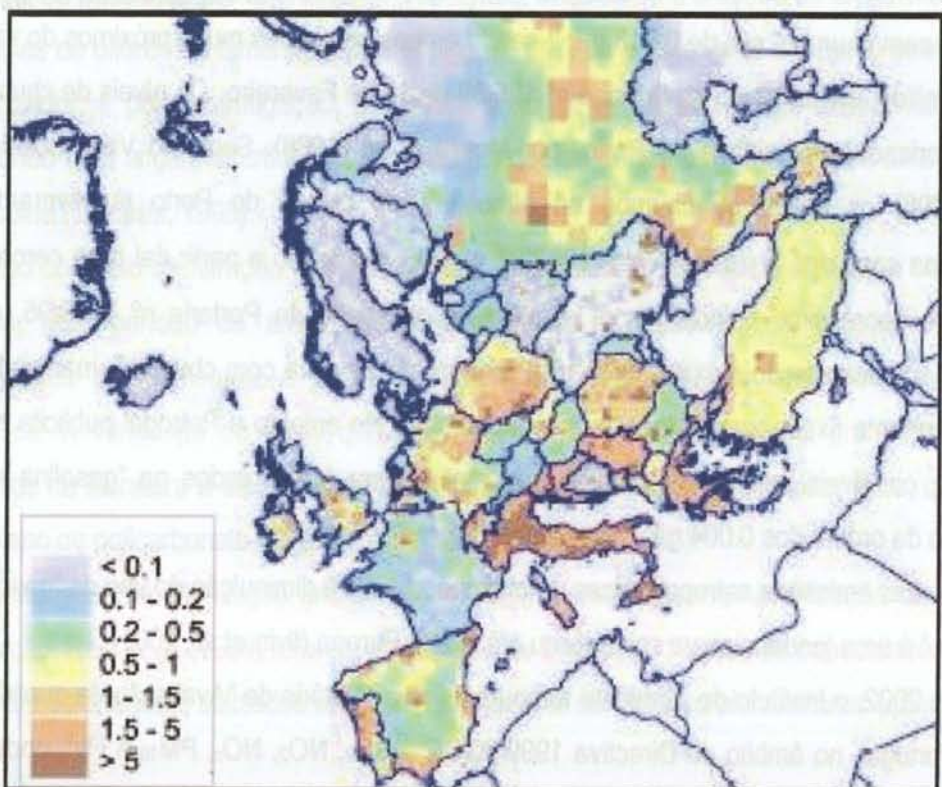
Para o caso do chumbo, os níveis de deposição, em diferentes partes da Europa, diferiram significativamente da tendência continental. A maior redução das deposições ocorreu na Europa Ocidental e do Norte. O decréscimo dos níveis de poluição nesses países, pôde ser atribuído a uma redução significativa das emissões nacionais. Reduções mais lentas, e menos acentuadas, foram características dos países da Europa de Leste e do Sul. A redução da deposição de cádmio na Europa foi mais lenta do que para o chumbo, devido à taxa mais lenta de redução das emissões antropogénicas e ao papel mais importante que desempenharam a emissão natural e re-emissão. Em contraste com o chumbo e cádmio, o mercúrio é um poluente que facilmente pode ser transportado, atmosféricamente, à volta do globo. Por esta razão, fontes de emissão localizadas noutros continentes tiveram um impacto significativo na poluição da Europa. Para além disso, a re-emissão e a emissão natural, contribuíram significativamente para a penetração de mercúrio na atmosfera (Ilyin *et al.*, 2003).

A discrepância da redução de emissões em diferentes partes da Europa, resultou num incremento da contribuição do transporte transfronteiriço, para a contaminação de países onde a redução de emissões foi significativa (Ilyin *et al.*, 2003).

A figura 1.3. apresenta a comparação entre quantidade de chumbo emitida e depositada, no continente Europeu, em 2001.



a)



b)

Figura 1.3. Distribuição espacial de deposição (a) e emissão (b) de chumbo ($\text{kg km}^{-2} \text{ano}^{-1}$), no continente europeu, em 2001 (adaptado de Ilyin *et al.*, 2003).

Um relatório divulgado pelo "Meteorological Synthesizing Centre – East", em 2001, permitiu estimar a evolução das emissões antropogénicas, em vários países europeus. Concretamente, no caso de Portugal, por falta de dados oficiais, utilizaram-se as previsões de Pacyna (1999) para o chumbo e mercúrio e as de Berdowski *et al.* (1997) para o cádmio.

A tabela 1.3. mostra as estimativas de emissão atmosférica de chumbo, mercúrio e cádmio desde 1990 até 2000, no nosso país.

Tabela 1.3. Emissões antropogénicas de chumbo, cádmio e mercúrio, para a atmosfera ($t \text{ ano}^{-1}$), em Portugal (adaptado de Ilyin *et al.*, 2001).

Ano	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Pb	630	604	577	551	524	498	471	445	418	392	365
Cd	3.0	3.04	3.08	3.12	3.16	3.2	3.24	3.28	3.32	3.36	3.0
Hg	5.50	5.44	5.37	5.31	5.24	5.18	5.11	5.05	4.98	4.92	5.0

Da análise da tabela pode-se concluir que, o decréscimo de emissões de chumbo tem sido constante, em grande parte devido à introdução da gasolina sem chumbo. Em Portugal, até Janeiro de 1996, a concentração média de chumbo na "gasolina com chumbo" era de 0.4 g L^{-1} e na "gasolina sem chumbo" era de 0.013 g L^{-1} , sendo ambos os valores muito próximos do valor máximo permitido, estabelecido na Portaria nº 125/89 de 18 de Fevereiro. Os níveis de chumbo foram monitorizados, na cidade do Porto, por Moura *et al.* (1988). Segundo Vasconcelos e Tavares (1998) os níveis de chumbo na atmosfera da cidade do Porto mantiveram-se constantes, na casa dos $5 \mu\text{g m}^{-3}$, entre 1986-87 e 1996, descendo a partir daí para cerca de metade. Este decréscimo coincidiu com o início da aplicação da Portaria nº 1489/95, que impunha uma concentração máxima de 0.15 g L^{-1} para a "gasolina com chumbo", mantendo o valor anteriormente fixado para a "gasolina sem chumbo". No entanto a Petrogal publicita que, actualmente, os níveis médios de chumbo que estão a ser incorporados na "gasolina sem chumbo" são da ordem dos 0.004 g L^{-1} , bastante inferiores ao legislado.

A diminuição das emissões antropogénicas de chumbo, devido à diminuição do uso de "gasolina com chumbo" é uma tendência que se verificou em toda a Europa (Ilyin *et al.*, 2001).

Em Julho de 2002, o Instituto do Ambiente tornou público o relatório de "Avaliação da qualidade do ar em Portugal, no âmbito da Directiva 1999/30/CE – SO_2 , NO_2 , NO_x , PM_{10} e Pb", onde se pôde verificar que as medições de chumbo efectuadas nas estações fixas, no período de 1996 a 2001, e as efectuadas nas estações móveis, durante o período em que decorreu a avaliação, se situaram sempre abaixo do Limite Inferior de Avaliação ($0.25 \mu\text{g m}^{-3}$), se bem que os autores

referissem a escassez de dados disponíveis a partir das estações fixas, como um factor a ter em conta.

Os cenários relativos às previsões futuras baseiam-se na progressiva implementação das “Melhores Tecnologias Disponíveis” e no progressivo cumprimento dos valores-limite impostos e que venham a ser propostos.

1.3.3. Quantificação de metais na atmosfera

O conhecimento da composição qualitativa e quantitativa do ar, aliado aos efeitos dos poluentes na saúde, é fundamental para a fixação de valores máximos admissíveis de concentração de poluentes. A monitorização de metais na atmosfera impõe-se em muitas situações, podendo ser realizada a diferentes níveis, os quais fornecem informações complementares.

A recolha de aerossóis é regularmente usada para a monitorização de atmosferas abertas. Estas recolhas podem ser efectuadas recorrendo a processos de filtração, em que o ar é forçado, por de uma bomba, através de um filtro; por impacto, em que jactos sequenciais, sucessivamente maiores, ou passando por aberturas decrescentes, fraccionam a amostra de ar, permitindo obter partículas de diferentes tamanhos; por “impinger”, em que o fluxo de ar é forçado através de um pulverizador; e por centrifugação, em que o fluxo de ar descreve uma espiral num ciclone, resultando uma acção centrífuga nas partículas, que as obriga a mover-se para uma superfície de recolha (Tavares, 1998).

No caso concreto da filtração têm sido usados amostradores de caudal elevado e baixo. Estes últimos, num período de amostragem usual (vinte e quatro horas), recolhem pequenas quantidades de elementos, e por isso exigem técnicas analíticas mais sensíveis que os primeiros. A variedade de filtros que se utilizam nestes amostradores é grande, tendo sido descritos na literatura a utilização de filtros de nitrato ou acetato de celulose, vidro, quartzo, de polietileno ou policarbonato, de teflon e de grafite (Tavares, 1998).

Em estudos de monitorização ambiental é também comum recorrer à utilização de baldes de deposição. Reis *et al.* (1999) referem a utilização de baldes de 10 litros de capacidade, com funis de 25 cm de diâmetro, utilizados simultaneamente com aerossóis e biomonitores liquénicos.

1.4. Monitorização Ambiental com Organismos Vivos

Diversos seres vivos têm sido usados em estudos de monitorização da atmosfera, tais como líquenes (Freitas *et al.* 1997a; 1997b; 1999), musgos (Tavares e Vasconcelos, 1996; Vasconcelos e Tavares, 1998) e algas (Hänninen *et al.*, 1993). Para além disso, é ainda comum realizarem-se estudos com materiais biológicos, como sejam casca (Kuik e Wolterbeek, 1994; Böhm *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2000) e folhas de árvores (Stratis *et al.*, 1995).

Bennett e Buchen (1995) organizaram uma base de dados onde contabilizaram quatrocentos artigos, sobre os efeitos de poluentes gasosos ou metais pesados em setecentas e trinta e cinco espécies diferentes, de líquenes e musgos.

Os líquenes, são um dos organismos mais usados, em estudos de biomonitorização de poluição atmosférica. No entanto, a falta de conhecimento das causas da sua variabilidade, dificulta a amostragem, introduzindo uma fonte de erro importante (Branquinho, 2001).

Na realização destes estudos é necessário ter um grande conhecimento das características dos organismos, bem como das suas interações com o restante ecossistema. Só assim será possível minimizar a ambiguidade entre resposta a um elemento causador de stresse e variabilidade natural dos organismos vivos, dentro da mesma espécie.

1.4.1. Variação em respostas ecológicas ao stresse

Os poluentes exemplificam uma classe de originadores de stresse que se encontra distribuída em soluções, partículas suspensas, sedimentos e alimentos. Logo, a exposição de cada espécie aos poluentes, é determinada pela forma como a espécie interage com cada uma destas variáveis (Thomann *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996).

Geralmente, as propriedades biológicas variam estocasticamente, se bem que uma “estabilidade dinâmica” também possa ser frequente. A caracterização destas duas componentes pode ser um ponto crítico. Perceber a variação natural de uma variável biológica é essencial para separar as mudanças por resposta ao stresse, das mudanças por flutuação que ocorrem mesmo na ausência de stresse. Infelizmente estas flutuações naturais, geralmente, não são conhecidas ou estão insuficientemente caracterizadas (Luoma *et al.*, 2001).

A resposta à questão de como separar a variação natural da variação induzida por stress deve ser encontrada tendo em conta as questões de interesse de um dado estudo e as escalas temporais e espaciais em que as questões do estudo operam (Luoma *et al.*, 2001).

Normalmente, separar as fontes de incerteza (variação estocástica natural, erros de amostragem e incerteza na relação entre os factores de controlo e a resposta biológica) não é uma tarefa fácil, admitindo que essas incertezas podem ser quantificadas, o que nem sempre é o caso. Mesmo depois de se terem tomado todas as precauções possíveis para minimizar os seus efeitos, o mais provável é que, no final, se tenha de escolher o grau de incerteza que é aceitável para um dado estudo (Luoma *et al.*, 2001).

Em estudos que envolvam múltiplos impactos devido ao stress, alguns cuidados podem ajudar a minimizar a influência da variação ambiental (Luoma *et al.*, 2001):

- reduzir a variação natural:
 - minimizar (através da metodologia da amostragem) componentes que operam abaixo das escalas temporais e espaciais relevantes;
 - estratificação de alguns componentes (especialmente à escala da unidade de amostragem);
 - caracterização dos componentes mais importantes (especialmente se operarem a uma escala mais elevada que a da unidade de amostragem);
- na análise estatística dos resultados, maximizar o poder e identificar o efeito do tamanho;
- sobre-amostrar as fontes de variação não conhecidas nas fases iniciais do estudo;
- restringir a caracterização de longo termo, aos factores ambientais cuja influência é mais provável.

Por não se conseguir eliminar, e muitas vezes quantificar, as incertezas, alguns autores propõem que se adopte o "Princípio da Precaução" que, segundo Gray e Bewers (1996) deve ser "aplicado a actividades humanas, para as quais exista um conhecimento científico, que permita supor que delas podem advir consequências gravosas para os ecossistemas. Os resultados devem basear-se em hipóteses pessimistas no que diz respeito à quantificação de incertezas e à previsão dos efeitos no ambiente".

1.4.2. Biomonitorização

A biomonitorização é um método de apreciação das alterações ambientais, através da quantificação de parâmetros nos organismos vivos. Wittig (1993) considera que a diferença entre bioindicação e biomonitorização é subtil, podendo utilizar-se ambos os termos como sinónimos. Para este autor “bioindicação” deve aplicar-se em estudos baseados no uso de organismos para obter informação sobre a qualidade do ambiente num determinado momento. Por outro lado, “biomonitorização” consiste na observação contínua, no espaço e/ou no tempo, dos organismos, permitindo a avaliação semi-quantitativa dos resultados e a avaliação continuada de variações ou tendências na situação ambiental.

Os indicadores biológicos são usados para observar a resposta biótica em relação ao stresse ambiental. Podem ser usados como aviso para impactos ambientais, que se encontram em curso, e/ou para medir o sucesso de medidas de remediação e restauração do ecossistema. Estes indicadores podem ser escolhidos a níveis diferentes. A escolha de um só taxon tem desvantagens pois não permite tirar conclusões à escala da comunidade, mas é a melhor escolha quando se pretende avaliar escalas temporais e espaciais relativamente curtas (Luoma *et al.*, 2001).

1.4.3. Características de um biomonitor

A escolha do biomonitor a utilizar reveste-se, por vezes, de algum carácter subjectivo, uma vez que a grande variabilidade inerente ao organismo vivo pode condicionar o nível de confiança dos resultados obtidos. Esta variabilidade pode ser minimizada, se o organismo utilizado reunir o maior número possível de características que definem o biomonitor ideal (Wittig, 1993):

- capacidade de acumulação mensurável do elemento químico;
- distribuição generalizada na área de estudo, permitindo a amostragem alargada e não enviesada;
- ausência de variações sazonais na quantidade disponível para amostragem;
- capacidade de acumulação diferenciada do poluente, relacionada com a intensidade de exposição ao factor ambiental; esta relação deve poder ser descrita de uma forma quantitativa ou semi-quantitativa;
- ausência de variações sazonais na capacidade de acumulação;

- acumulação do elemento químico apenas pela via que se quer avaliar;
- identificação taxonómica fácil;
- estar suficientemente estudado (fisiologia, ecologia, morfologia);
- ausência de perda do elemento químico por excreção ou lixiviação.

1.4.4. Características gerais dos líquenes

Os líquenes são organismos simbióticos compostos por um fungo (o micobionte) e por um ou mais organismos fotossintéticos, que tanto podem ser clorófitas como cianobactérias (o fotobionte). É mais frequente a existência de um único fotobionte e, na maioria das espécies, o fotobionte é uma alga (Branquinho, 2001).

Possuem uma distribuição geográfica impressionante pois encontram-se desde a costa até às altas montanhas e, apesar de serem especialmente abundantes em habitats polares, também ocorrem em ecossistemas tropicais. Para além disso, em áreas não poluídas, o seu crescimento é conspicuo, maioritariamente em cima de rochas e troncos de árvores (Richardson, 1992; Nash, 1996).

Os líquenes dividem-se, quanto à morfologia do talo, em crustáceos, foliáceos e fruticulosos. Os tipos foliáceo e fruticuloso, devido à facilidade com que se destacam do substrato, são os mais usados em estudos de biomonitorização (Garty, 2002).

Crescem a uma taxa relativamente lenta mas persistem por dezenas, ou mesmo centenas de anos no seu substrato. Para além da reprodução sexuada, desenvolveram meios de propagação vegetativa através de estruturas diversificadas, tais como sorédios e isídios. São organismos poiquilohídricos uma vez que podem perder a maioria da água retida no seu talo e recuperar a actividade metabólica após re-hidratação (Beckett, 2002), apresentando taxas de hidratação directamente dependentes das variações de humidade atmosférica, por mais pequenas que estas sejam (Wittig, 1993). Isto torna-os extremamente dependentes da precipitação, principalmente na forma de chuva, mas também na forma de nevoeiro e orvalho (Nash, 1996). Para além disso, têm uma capacidade excepcional de obterem hidratação de atmosferas não saturadas, quando a temperatura é baixa e a humidade é elevada (Nash, 1996).

1.4.5. Acumulação de metais em líquenes

Os líquenes acumulam metais, quer aprisionando partículas insolúveis (geralmente óxidos, sulfatos e sulfitos), quer através de trocas iónicas, de metais dissolvidos, nas paredes celulares. Esta troca iónica é por vezes acompanhada de uma entrada de metais para a célula (Richardson, 1992).

Os líquenes podem conter níveis apreciáveis de uma larga gama de metais, sem que isso interfira com o seu metabolismo, desde que, esses metais não sejam tóxicos ou desde que sejam acumulados sob a forma de partículas insolúveis (Nieboer e Richardson, 1980).

As partículas atmosféricas são aprisionadas exactamente da mesma forma que as partículas do substrato. Ficam enredadas entre as hifas em crescimento e parecem acumular-se no talo, na região central da medula, em que o arranjo das hifas é mais frouxo (Richardson, 1992). À volta de fontes de poluição a ocorrência de partículas aprisionadas nos líquenes foi verificada usando técnicas de microscopia electrónica de varrimento (Garty *et al.*, 1979; Jones *et al.*, 1982).

A cinética e termodinâmica das reacções de troca iónica em líquenes são bem conhecidas. Este é um processo físico-químico, passivo e rápido que ocorre extracelularmente, atingindo-se a saturação em poucos minutos (Nieboer e Richardson, 1980).

Muitos metais ligam-se a locais específicos da parede celular dos líquenes. Os metais que se encontram ligados à parede celular podem ser desalojados por outro metal, com maior afinidade para o local de ligação iónica, ou por outro metal, com menor afinidade, mas presente em maior concentração (Richardson, 1995).

Nos locais de ligação iónica os metais da Classe B deslocam os metais da Fronteira e estes deslocam os metais da Classe A (Nash, 1996).

Assim, os líquenes comportam-se como resinas de troca iónica, absorvendo iões metálicos a partir da água da chuva e libertando iões de hidrogénio, ou iões metálicos de baixa afinidade, à medida que o processo avança (Richardson, 1992).

Em contraste com o processo de troca iónica, a troca iónica com entrada do metal para a célula envolve, geralmente, um fluxo muito menor (Beckett e Brown, 1984). A concentração intracelular aumenta com o tempo, mas é um processo que demora horas e frequentemente segue o modelo cinético proposto por Michäelis-Menten (Beckett e Brown, 1984).

Alguns dos iões pertencentes ao grupo dos nutrientes essenciais, como o potássio, são predominantemente acumulados dentro da célula, ligando-se à parede celular de forma transitória e por ligações fracas. Contudo, outros metais essenciais, como o zinco, o cobre e o magnésio, tanto se ligam fortemente à parede celular como são acumulados dentro das células (Richardson, 1995). Starling e Ross (1990) sugeriram que os iões essenciais entram para a célula através de mecanismos de transporte dependentes de energia, existindo um destes mecanismos para cada um dos elementos.

Para além disso pensa-se que o processo de entrada de elementos para a célula é essencialmente físico-químico, envolvendo muito pouco controlo biológico por parte do líquene (Nash, 1996).

1.4.6. Características dos líquenes como biomonitores

Os líquenes apresentam um conjunto de características, que os favorecem como monitores ambientais (Puckett, 1988; Nash, 1996; Bargagli *et al.*, 1997; e Garty, 2002):

- como não possuem camadas protectoras, tais como camadas cerosas e cutícula, toda a área superficial absorve os gases e os aerossóis;
- normalmente o substrato é apenas utilizado para fixação, não tendo funções nutritivas;
- crescem e têm actividade fotossintética ao longo de todo o ano, o que lhes permite uma acumulação contínua dos elementos a analisar;
- a sua morfologia não varia consideravelmente ao longo do ano;
- acumulam quase todos os elementos da tabela periódica;
- a generalidade das espécies apresenta-se distribuída em áreas geográficas muito vastas;
- estão presentes em todo o mundo, permitindo a comparação de dados em diversas regiões do planeta e permitindo uma elevada densidade de pontos de amostragem, o que é indispensável para desenhar mapas fiáveis de deposição de metais;
- nem todas as espécies exibem a mesma sensibilidade aos poluentes;
- reflectem padrões de deposição temporal a longo termo;
- a concentração de elementos vestigiais no talo é quantificável com procedimentos analíticos comuns;

Da lista de características apresentadas por Wittig (1993) para definir o biomonitor ideal, pode-se dizer que os líquenes reúnem a maioria dos itens considerados. No entanto, pode-se questionar o facto de apenas acumularem metais por uma via, pois foi proposto que os líquenes teriam também a capacidade de retirar elementos a partir do substrato (Goyal e Seaward, 1981; Prussia e Killingbeck, 1991; Loppi et al., 1999). Os líquenes podem causar o desgaste da superfície das rochas, através de processos físicos e mecânicos. Após solubilização, os elementos podem ser usados pelos líquenes.

Estudos efectuados em Portugal com a espécie *Parmelia sulcata* (Freitas et al., 1997b) recorreram a amostragens feitas exclusivamente em oliveiras, para obviar a variação devida à diferença de substratos. No entanto, na Holanda, de Wit (1996), comparou os substratos carvalho, salgueiro, choupo e olmo (todos com pH neutro) sem que verificasse alterações na composição química da espécie de *Parmelia* sp. recolhida.

Alguns autores (Nieboer et al., 1975) propuseram um método para distinguir acumulações devidas ao substrato de deposições da atmosfera.

Outra das características mencionadas por Wittig (1993), prende-se com o facto de o elemento químico não dever ser perdido por excreção ou lixiviação.

É sabido que a concentração de elementos no talo líquénico é resultado do equilíbrio entre entrada e saída de elementos de, e para, o ambiente. Para além disso, os mecanismos de entrada e saída de elementos não estão ainda suficientemente estudados (Branquinho, 2001).

Por outro lado, pode-se também considerar algumas vantagens em relação aos métodos físico-químicos normalmente utilizados (Richardson, 1992; Garty, 2002):

- a monitorização automática está bastante avançada no que toca a determinar a concentração de gases tais como SO₂, NO_x, CO e O₃, no ar, enquanto que para níveis de metais pesados está pouco documentada;
- para além disso, a monitorização automática não dá informação sobre a biodisponibilidade dos poluentes e não tem em conta os seus efeitos biológicos, podendo levar a sub-estimar possíveis efeitos para a saúde, uma vez que alguns metais têm comportamento sinérgico, no que toca à toxicidade, e o risco pode existir mesmo com doses de exposição muito baixas.
- é possível abarcar grandes áreas de estudo, com um menor esforço financeiro.

1.4.7. Utilização de casca de árvores para estudos de monitorização ambiental

Os estudos em que a casca de árvore tem sido utilizada para monitorizar a poluição atmosférica têm-se concentrado essencialmente junto a vias rodoviárias, no sentido de determinar a relação entre concentração em metais e distância a vias com tráfego intenso, e junto a locais com indústrias específicas (Wolterbeek e Bode, 1995; Favas *et al.*, 2002).

Duas vantagens de se usar este material são o facto de ser simples amostrar uma grande quantidade e o facto de as espécies de árvores serem facilmente reconhecidas. Algumas desvantagens da sua utilização são a possibilidade de os metais se depositarem superficialmente, tornando-os passíveis de serem lavados, de os metais serem perdidos por transporte no floema (ou que ocorra transporte radial de e para o xilema) e o facto de os períodos de acumulação serem muito longos (Wolterbeek e Bode, 1995).

Para se proceder à recolha é necessário que se defina o material sobre o qual irá versar o estudo. A casca dos troncos das árvores é formada pelo felogénio. Este câmbio produz para o exterior células de parênquima cujas paredes são impregnadas de suberina (células mortas) e para o interior a feloderme, que substitui o córtex.

Na prática, é normal que as amostras sejam apenas retiradas da camada morta mais externa (dois a três mm de espessura) (Sloof e Wolterbeek, 1991).

Os efeitos do transporte pelo floema nos níveis de elementos vestigiais da casca estão ainda mal conhecidos. Os elementos depositados podem ser lavados, resultando numa descida no conteúdo mineral da casca, mas, por outro lado, o floema pode transportar grandes quantidades de elementos, desde as folhas e ramos até partes mais baixas do caule. Como resultado poderá ocorrer um gradiente consoante a distância em relação ao solo, o que significa que a altura de amostragem deve ser estandardizada (Martin e Coughtrey, 1982). Wolterbeek e Bode (1995), aconselham uma altura de 1.5 m acima do solo.

1.4.8. Utilização de biomonitores para estimar poluentes atmosféricos

Os líquenes têm sido tradicionalmente usados como bioindicadores, quando a poluição atmosférica provoca uma mudança na composição das suas comunidades, ou seja, espécies mais sensíveis desaparecem de áreas poluídas, enquanto espécies mais tolerantes sobrevivem em áreas com emissão de poluentes (Wetmore, 1988).

Nos estudos em que os líquenes são usados como bioindicadores são usuais duas abordagens: obtenção de mapas de biodiversidade, baseados na flora líquênica, e o cálculo de Índices de Pureza Atmosférica, proposto inicialmente por LeBlanc e de Sloover, em 1970 (Branquinho, 2001).

Logo após a Revolução Industrial os naturalistas começaram a notar que raramente se encontravam líquenes em locais onde o ar era considerado impuro (Turner e Borrer, 1839). Em 1859, Grindon atribuiu o declínio de líquenes, em volta de grandes centros urbanos, à poluição atmosférica. No entanto, apenas na segunda metade do século dezanove, é que Nylander (1866) sugeriu que os líquenes poderiam ser usados como indicadores do grau de poluição do ar. Só com os trabalhos pioneiros de Skye (1958) é que se começaram a documentar limites de tolerância para determinadas espécies.

Em 1970, Hawksworth e Rose definiram uma escala em que a concentração atmosférica média de Inverno, de SO_2 , podia ser estimada, dentro de um dado intervalo, com recurso à identificação das espécies de líquenes que ocorriam no local em estudo. Esta escala revelou-se um método bastante fiável para determinar as concentrações de SO_2 na atmosfera e foi amplamente usada para caracterizar atmosferas em muitas cidades, embora hoje em dia tenha caído em desuso, devido à diminuição dos níveis deste poluente na Europa e América do Norte. van Herk e Aptroot (1996) e Aptroot e van Herk (1998) monitorizaram a progressiva recuperação de espécies sensíveis ao SO_2 , na Holanda, registando o aparecimento de espécies que já não se viam há quase um século e de espécies desconhecidas para os cientistas, que nunca tinham sido descritas. Contrariamente ao SO_2 , para os óxidos de azoto e amónia não se tem registado a mesma diminuição. Segundo van Herk (1999), actualmente, a poluição com NH_3 é a maior causadora de mudança na flora líquênica. O autor refere um método, para mapeamento da poluição com amónia usando líquenes epifíticos, que foi utilizado num programa de monitorização na Holanda, e que permite obter padrões espaciais detalhados da concentração de NH_3 . A hipótese de construção de uma escala semelhante, para o caso dos metais na atmosfera, ainda não está posta de lado, embora esse trabalho se esteja a revelar bem mais difícil do que para o caso do SO_2 ou NH_3 (Seaward, 1989; Richardson, 1992).

Por outro lado, os líquenes têm sido usados como biomonitores da contaminação por metais provenientes de fontes antropogénicas.

A ideia de transplantar talos de líquenes, recolhidos numa área não poluída, para uma área poluída a estudar, surgiu com Brodo (1961, 1968), que utilizou o líquene *Parmelia caperata*, para monitorizar as condições atmosféricas da cidade de Nova York.

A partir de então, os estudos de transplantes ganharam uma grande aceitação, não só devido à possibilidade de se avaliar a qualidade do ar de áreas poluídas, mas também pela possibilidade de detectar variações da composição do ar antes e depois da construção de uma fábrica, central termoelétrica, desactivação de uma mina e outras situações de impacto provocadas pelo ser humano (Garty e Fuchs, 1982; Dillman, 1996; Bargagli *et al.*, 1997).

Por exemplo, Garty e Fuchs (1982) verificaram que, após 8 meses de exposição, transplantes colocados junto a um cruzamento, em Telavive, apresentavam valores de $246 \mu\text{g g}^{-1}$ de chumbo, enquanto que os controlos apresentavam valores da ordem dos $12 \mu\text{g g}^{-1}$. Simultaneamente, no mesmo estudo, outros transplantes colocados junto a outro cruzamento registaram valores de $105 \mu\text{g g}^{-1}$ de chumbo, em comparação com transplantes colocados a 700m de distância destes últimos, que apenas registaram o valor de $35 \mu\text{g g}^{-1}$.

Em nenhum destes casos se pode inferir sobre o teor atmosférico de chumbo. Somente se pode comparar duas áreas diferentes e dizer em qual delas o teor de chumbo, na atmosfera, será mais elevado. Aliás, estudos deste género, foram largamente utilizados, primeiro, para verificar que existia uma relação directa entre tráfego automóvel e teor em chumbo na atmosfera e depois, para verificar a eficácia da implementação da obrigatoriedade de utilização de gasolina sem chumbo.

No entanto, noutros estudos sobre poluição atmosférica, conseguiu-se obter uma relação quantitativa. Trabalhos de Saeki *et al.* (1977) revelaram uma correlação entre o conteúdo em metais de líquenes e o conteúdo em metais de filtros que acumulavam partículas urbanas.

Tavares e Vasconcelos (1996), fazendo amostragens simultâneas, no mesmo local, com aerossóis de baixo-volume e com o musgo *Sphagnum auriculatum*, propuseram o factor de conversão: "concentração de chumbo no musgo ($\mu\text{g g}^{-1}\text{dia}^{-1}$) / concentração de chumbo no ar (g m^{-3})" que permite relacionar os níveis medidos em *S. auriculatum* com os níveis atmosféricos, durante o tempo seco. As autoras propõem que os locais sujeitos a monitorização biológica sejam primeiro calibrados usando a monitorização instrumental. A partir desses dados poder-se-á relacionar as concentrações obtidas com base na monitorização biológica, com as concentrações atmosféricas, com um nível de confiança estatisticamente aceitável.

Mas não é só a medição de metais presentes no transplante, que fornece indicações acerca do ambiente ao qual o líquene está exposto. Pode-se, também, avaliar parâmetros fisiológicos que indiquem uma lesão induzida por exposição a metais. Richardson (1992) considera que a velocidade com que estes sintomas se desenvolvem, e a sua severidade, estão directamente

relacionados com a distância à fonte de poluição, sendo que as mudanças ultraestruturais precedem sempre a morte das células.

Segundo Branquinho (2001) nos estudos fisiológicos de biomonitorios, as avaliações mais comuns dizem respeito a mudanças morfológicas, variações na vitalidade e mudanças nas respostas funcionais.

Em relação à manutenção da vitalidade, convém realçar os trabalhos desenvolvidos por Tavares e Vasconcelos (1996) e Tavares (1998) com o musgo *Sphagnum auriculatum*. Com efeito, durante períodos de exposição de dois meses, verificaram, através de testes de plasmólise, que o organismo exposto morria ao fim do primeiro mês, mas que continuava a acumular chumbo da atmosfera, regularmente, até ao final do segundo mês.

A membrana celular é um local de acção tóxica de metais, e a perda de iões, particularmente de potássio, do interior de células, tem sido usado por muitos autores como indicador da integridade da membrana de líquenes (Nieboer e Richardson, 1979; Brown e Beckett, 1985; Branquinho, 1997b).

O amarelecimento do talo líquénico, resultado da degradação de clorofilas é um dos indicadores mais óbvios de dano provocado por poluentes atmosféricos (Garty *et al.*, 1985; Garty *et al.*, 1992).

Os pigmentos fotossintéticos são normalmente determinados por métodos espectrofotométricos, usando solventes orgânicos, apesar dos progressos feitos na área da cromatografia, com destaque para cromatografia líquida de alta performance. A acetona (80%) tem sido o solvente mais referido na literatura para a extracção de clorofilas, essencialmente devido ao facto de o coeficiente de extinção ter sido cuidadosamente calculado por Lichetenthaler, em 1987. No entanto, em 1984, Ronen e Galun propuseram a extracção de pigmentos fotossintéticos usando dimetil sulfoxido (DMSO), por ser um solvente em que a extracção é simples, rápida e completa, e em que as amostras podem ser armazenadas a baixas temperaturas, sem se degradarem.

Ronen e Galun (1984) mostraram que a razão da densidade óptica entre 435 nm e 415 nm é um parâmetro que permite estimar a degradação de clorofila, quando os pigmentos são extraídos com dimetil sulfoxido. Diversos autores (Garty, 1993; Silberstein, 1996) utilizaram este parâmetro em estudos de mudanças nas respostas funcionais.

A fluorescência da clorofila tem sido usada para estudar a influência de contaminantes na cadeia electrónica do fotossistema II. A razão entre fluorescência variável de clorofila e fluorescência máxima (F_v/F_m) tem sido usada como um parâmetro para avaliar o funcionamento do aparelho fotossintético em líquenes (Branquinho, 1997a).

Garty (1992) sugeriu que alguns metais, como o chumbo, cobre, ferro e zinco são responsáveis pela degradação das clorofilas, tanto em estudos laboratoriais, como em avaliações feitas no campo. Por outro lado, o mesmo autor sugere que a presença de potássio protege a clorofila do fotobionte de degradação e possivelmente estimula a síntese de clorofila.

Em relação a estudos atmosféricos envolvendo casca de árvores, Hofmann *et al.* (2001), amostraram casca de carvalho (*Quercus spp*) em 52 localizações na Alemanha, determinando 55 elementos. Os dados obtidos permitiram calcular um "Índice de Poluição Atmosférica Monitorizada com Casca". Os resultados obtidos estavam relacionados com dados provenientes de modelos de dispersão e estudos de poluição e mostraram gradientes significativos de elementos em relação às fontes de poluição testadas. Em volta de uma indústria de processamento de aço, encontraram-se gradientes de ferro, cobre, crómio, manganésio, níquel e vanádio, todos típicos do processamento deste material. Os gradientes apresentavam a mesma forma mas mostravam diferenças na extensão, de acordo com as taxas individuais de emissão de cada elemento. Paralelamente, junto a fundições de zinco e chumbo, gradientes significativos de chumbo, cádmio, crómio e zinco, eram visíveis.

Poikolainen (1997) amostrou cascas de pinheiro, no norte da Finlândia (Lapónia), para ilustrar a distribuição de metais nessa área. As concentrações de metais obtidas foram baixas, para quase todos os metais em estudo, e concentrações mais elevadas de cobre, níquel e crómio foram atribuídas à indústria da Península de Kola, no sudoeste da Lapónia.

Também com casca de pinheiro, estudos de Huhn *et al.* (1995), em ecossistemas florestais da Alemanha, permitiram revelar correlações entre os teores de ferro, níquel, crómio, cobre e chumbo, que eram emitidos das indústrias sob a forma de cinza e pó, acumulando-se na casca das árvores.

Num estudo realizado na Grécia, na cidade de Tessalónica, Sawidis *et al.* (1995), mostraram que, as árvores que se encontravam mais próximas do centro da cidade, continham um teor em metais superior ao de árvores a 15 km de distância do centro. As concentrações obtidas para cobre variaram de 5 a 10 mg kg⁻¹, enquanto que para o chumbo as concentrações variaram de <1.5 a 4.5 mg kg⁻¹, sendo as mais altas em *Populus alba* e as mais baixas em *Populus niger*.
Noutra cidade europeia, Nápoles, gradientes de concentração, para cobre, chumbo e ferro, foram obtidos analisando tecidos e folhas da espécie *Quercus ilex* (Alfani *et al.*, 1996).

Pacheco *et al.* fizeram amostragens na costa de Portugal, de casca de oliveira e de líquenes, recolhidos nos mesmos locais. Apesar de as concentrações dos elementos serem mais baixas na casca do que no talo líquénico, obtiveram-se correlações entre os dois biomonitores.

1.5. Monitores orgânicos sintéticos

1.5.1. Resinas de Troca Iónica

Comercialmente há uma vasta gama de opções de sólidos de troca iónica, sendo que todos apresentam um núcleo sólido com uma superfície quimicamente reactiva. Estes sólidos de troca iónica podem ser divididos em três categorias: catiónicos, aniónicos e sólidos de troca quelantes (Howard e Statham, 1993).

As resinas de troca iónica são polímeros sintéticos, insolúveis e reactivos, que se assemelham a ácidos, bases ou sais, na sua forma de reagirem. A diferença entre as resinas e os grupos citados é que nestas, apenas os aniões ou catiões estão livres para tomarem parte numa reacção química. Estas reacções de troca de iões da resina por iões do meio podem ocorrer tanto em meio aquoso, como não-aquoso. Devido à sua grande utilização, a cinética e termodinâmica destas reacções de troca iónica estão bem caracterizadas (Leal, 1993). O mecanismo de permuta iónica realiza-se em 5 etapas perfeitamente diferenciadas (Leal, 1993):

1. difusão do catião até à resina. O catião é transportado com a ajuda da agitação da solução. Apesar da agitação uma película de líquido não agitado rodeia o grão de resina; A espessura dessa película é da ordem dos 10^{-2} a 10^{-3} cm, dependendo do grau de agitação. O catião tem de atravessar essa película de líquido para que possa ocorrer permuta;
2. difusão do catião no interior da resina até encontrar o grupo funcional;
3. permuta química entre o catião da solução e o da resina;
4. difusão no interior da resina, do catião permutado, até à superfície;
5. difusão do catião permutado através da solução. O catião atravessa a película estacionária de solvente e difunde-se na solução.

O princípio da electroneutralidade determina que as etapas 1 e 5 ocorram simultaneamente e com velocidade igual. A etapa mais lenta é a que governa a velocidade de permuta. Geralmente

a permuta química dos iões móveis nos grupos iónicos fixos é a etapa mais rápida, e a etapa mais lenta corresponde à difusão dos iões móveis (Leal, 1993).

As resinas mais comuns consistem em redes tridimensionais, irregulares, de cadeias de hidrocarbonetos. Normalmente são baseadas numa matriz de co-polímero de estireno-divinilbenzeno, sendo a proporção de estireno-divinilbenzeno que regula o grau de cruzamento do polímero. As resinas com baixo grau de cruzamento do polímero não são fisicamente fortes mas, em contrapartida, oferecem taxas de troca mais elevadas (Howard e Statham, 1993).

As resinas Chelex (Bio-Rad) contêm iões de iminodiacetato, ligados a um suporte de estireno-divinilbenzeno.

Aos grupos carregados associa-se um contra-ião para assegurar a neutralidade da resina. As formas mais comuns são a associação de sódio ou hidrogénio. Para além disso, as resinas dividem-se ainda em ácidas fortes ou fracas, de acordo com a natureza do grupo ácido à superfície da resina (Howard e Statham, 1993).

Neste trabalho utilizou-se a resina Chelex 100 na forma sódica (Bio-Rad). A resina possui um certo grau de preferência para um ião relativamente a outro, mesmo que os dois estejam em quantidades equivalentes. Este é o fenómeno da selectividade em permuta iónica, e muitas aplicações das resinas derivam deste fenómeno (Leal, 1993). A selectividade da resina Chelex 100, para os diferentes catiões, é a mesma do ácido iminodiacético, embora o pH, a força iónica e a presença de outras espécies complexantes tenham influência.

A resina Chelex 100 (Bio-Rad) tem a propriedade de formar complexos estáveis, com os catiões metálicos, pela seguinte ordem de selectividade: metais pesados > alcalino-terrosos >> alcalinos (Lamathe, 1979).

A aplicabilidade das resinas de troca iónica tem sido descrita maioritariamente para tratamento de águas. A sua utilização em estudos ambientais prende-se, essencialmente, com a pré-concentração e extracção de elementos vestigiais, e com a separação de analitos, utilizando geralmente cromatografia de troca iónica. No entanto as extracções usando técnicas de "batch" são também frequentemente citadas na literatura (Figura e McDuffy, 1980).

Segundo Skogley e Dobermann (1996), diversos trabalhos têm sido publicados tirando partido da capacidade das resinas para fornecerem respostas a problemas cuja abordagem clássica é complicada. Incluem-se, dentro destes, estudos com solos, com especial ênfase para a biodisponibilidade de nutrientes.

1.5.2. Acetato de Celulose

O acetato de celulose é um polímero que se obtém da reacção da celulose com o ácido acético e cuja utilização na indústria passa pelo fabrico de fibra, vidro resistente ao choque e filmes fotográficos, quando usado na forma de termoplástico, entre outras aplicações.

Tanto quanto se sabe, nunca foi utilizado para estudos de monitorização ambiental por exposição à atmosfera exterior, não se conhecendo por isso a sua reacção a essas condições.

1.6. Enquadramento deste estudo

Pretendeu-se, com este trabalho, caracterizar biomonitores (líquenes e casca inteira e líquenes e casca moídos) relativamente à disponibilidade de elementos químicos na atmosfera, assim como avaliar o desempenho de monitores orgânicos sintéticos (resinas de troca iónica e acetato de celulose), por comparação com o desempenho de biomonitores já bem estudados (líquenes), de forma a minimizar a remoção dos organismos do seu habitat, para utilização em estudos de monitorização de metais na atmosfera.

A utilidade e adequação do uso combinado de biomonitores foi proposta por diversos autores. Para já, os estudos de casca de árvores como biomonitores, são em menor quantidade do que estudos com líquenes, e muitos deles relacionam-se com a acidificação do meio ambiente. Pelo facto de, a remoção de casca, não ter consequências para o metabolismo da árvore, vários autores têm proposto a utilização deste biomonitor, em detrimento de líquenes, que são organismos de crescimento lento, podendo a sua recolha para estudos de biomonitorização atmosférica comprometer a comunidade líquénica, do local donde se retiram os exemplares.

A biosorção pode ser definida como a ligação de espécies químicas a biopolímeros e, geralmente, refere-se apenas à ligação passiva ou físico-química à biomassa (Aderhold *et al.*, 1996). Alguns trabalhos recentes, em meio aquoso, indicaram que biomassas de algas poderiam funcionar bem como biosorventes (Fogarty *et al.*, 1999). Tanto quanto se conseguiu apurar, não há trabalhos publicados sobre a utilização de biomassa de líquene como biosorvente de metais (quer em meio aquoso, quer ao ar), embora vários trabalhos descrevam que os líquenes vivos têm uma grande afinidade para metais em solução (Branquinho, 1999).

Há muito poucas publicações de resultados da aplicação de polímeros sintéticos de troca iónica, como monitores atmosféricos (Irgum, 1987). Embora possam existir outras referências a este

assunto na literatura, o facto é que não é uma aplicação comum dada às resinas, nomeadamente às resinas Chelex 100, embora a sua grande afinidade para cationes metálicos, em meio aquosos, seja largamente reconhecida (Gomes, 1999).

Procurou-se, com este estudo, comparar o desempenho de líquene e casca moída (biomassas) com o desempenho dos biomonitores expostos inteiros, assumindo que:

- por não se tratar de um organismo vivo estaria menos sujeito à variabilidade devida ao metabolismo próprio de cada organismo;
Este é um parâmetro que afecta os resultados obtidos com organismos vivos e que dificulta o tratamento estatístico dos dados, principalmente quando o estudo envolve um reduzido número de réplicas, como é o caso deste;
- o processo de moagem poderia expor mais locais nas paredes e membranas celulares, que se sabe serem locais de ligação de metais, o que permitiria maiores acumulações do que as registadas para biomonitores inteiros.

Por outro lado, tentou-se otimizar os estudos de transplantes realizados com líquenes, expondo líquenes destacados do substrato, cortados em formas rectangulares. Este processo, comparado com os transplantes tradicionais, tem as seguintes vantagens:

- a quantidade de líquene gasto na exposição é muito menor;
- permite quantificações exactas da área de líquene exposta.

Paralelamente, optou-se por caracterizar o estado fisiológico dos líquenes e líquene moído exposto, para perceber até que ponto o processo de moagem, ou de destacamento do substrato e corte, teriam consequências no normal funcionamento metabólico. Esperava-se que ambas as formas (líquene moído e líquene destacado), mantivessem a vitalidade característica do líquene no substrato, o que permitiria considerá-los adequados a exposições tão longas como as que são geralmente realizadas com transplantes.

As mesmas preocupações (redução da variabilidade intrínseca ao organismo vivo e redução da quantidade de líquene que se retira do meio ambiente), fizeram com que se tentasse reproduzir os resultados obtidos com os biomonitores, com monitores orgânicos sintéticos: resina Chelex 100 e acetato de celulose, ambos materiais que poderiam ser expostos na forma granulada em que se iriam testar os monitores moídos. Se se verificassem acumulações de metais pesados, por parte desses monitores, comparáveis com as registadas pelos líquenes, esses monitores

teriam as mesmas vantagens, que fazem da utilização de líquenes bons biomonitores (capacidade de cobrir uma grande área de estudo, sem custos elevados, para praticamente todos os elementos da tabela periódica), sem apresentarem duas das desvantagens que mais têm contribuído para a procura de alternativas aos biomonitores tradicionais (elevada variação natural e a limitação do número de organismos, que se pode retirar de um ecossistema).

2. Material e Métodos



2.1. Exposição

2.1.1. Biomonitorios e monitores sintéticos utilizados

Utilizaram-se dois tipos de biomonitorios (líquene e casca) e dois tipos de monitores orgânicos sintéticos (acetato de celulose e resina Chelex 100 na forma Na⁺).

Os biomonitorios foram expostos inteiros ou moídos. O líquene inteiro foi exposto sob a forma destacada ou agarrada ao substrato.

A nomenclatura adoptada para referir cada um dos materiais expostos foi a seguinte:

- líquene no substrato
- líquene destacado
- líquene moído
- casca inteira
- casca moída
- acetato de celulose
- resina

2.1.2. Local de Amostragem

Sendo um projecto de âmbito nacional as amostragens foram realizadas em Viana do Castelo, Porto e Sines, sendo o Porto a estação piloto, por conveniência nas deslocações.

Os amostradores foram colocados no Jardim do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. A 10 m desse local encontra-se uma via de acesso à auto-estrada A1, sendo um local de tráfego intenso, mas o local de amostragem encontra-se parcialmente protegido por uma fila de árvores, junto à divisória com a estrada.

Em Viana do Castelo e em Sines foram colocados nos terrenos pertencentes às estações meteorológicas. A estação de Viana encontra-se na periferia da cidade, à entrada da povoação da Meadela, situada junto a uma estrada de tráfego intenso, mas os seus terrenos encontram-se protegidos por muros, situando-se o local de colocação dos amostradores relativamente resguardado. A estação de Sines encontra-se fora da cidade, numa zona tipicamente industrial com uma refinaria, uma central termo-eléctrica e uma petrolífera. Por essa razão o tráfego de

automóveis e barcos é intenso. É uma zona bastante ventosa, existindo moinhos de vento para produção de energia eólica perto da estação.

Nos três locais há disponibilidade de elementos antropogénicos bem como de elementos marítimos.

Para suportar os amostradores utilizaram-se suportes cilíndricos de plástico, fixos ao chão por meio de espigas. No topo do cilindro (1.70 m acima do solo, aproximadamente) encontrava-se uma estrutura semelhante a um chapéu, onde se prendiam os amostradores, por meio de fio de pesca (Freitas *et al.*, 1997a). Na figura 2.1. pode ver-se o suporte com alguns amostradores colocados.



Figura 2.1. Suporte de exposição dos monitores sintéticos e biomonitores, com protecção directa da chuva.

2.1.3. Amostradores

Na exposição utilizaram-se amostradores plásticos, da marca Millipore, cuja tampa foi recortada internamente, a fim de se obter apenas o aro periférico. Em contacto com o plástico colocou-se uma tela de poliamida de marca Sefar PA1000 (61 μm de porosidade), sobre a qual se colocou o material a expor: 250 mg para o líquene moído; 400 mg para a casca moída; 100 mg para líquenes destacados (peso fresco); 2.0 g para a resina Chelex 100 na forma Na^+ (peso fresco) e 400 mg para o acetato de celulose. Por cima do material colocou-se outra tela idêntica e prendeu-se o conjunto com o aro da tampa do amostrador plástico. O conjunto foi amarrado com fio de pesca e pendurado verticalmente nos suportes.

Em cada caso, o material cobria completamente a área livre de exposição do amostrador, excepto para os líquenes cortados. A espessura dessa camada de exposição foi arbitrada como sendo, sensivelmente, de 2 mm, embora não se mantivesse constante durante todo o tempo de exposição, uma vez que o material tendia, gradualmente, a acumular-se em baixo.



Figura 2.2. Amostradores plásticos contendo casca moída.

Colocaram-se líquenes inteiros e cascas de árvore inteiras em redes de malha laxa, segundo as técnicas tradicionais para transplantes, em que o material a expor é totalmente envolvido por uma rede, pendurada verticalmente a partir do suporte.



Figura 2.3. Amostradores com casca moída e redes de malha laxa com líquene e casca inteiros.

2.1.4. Tempo de Exposição

Realizaram-se três campanhas de exposição, de aproximadamente 60 dias cada, com o intuito de comparar a resposta dos monitores durante várias estações do ano:

Campanha de Inverno - entre 7/11/2002 e 6/1/2003 (Porto)

Campanha de Primavera - entre 5/3/2003 e 5/5/2003 (Porto)
entre 7/3/2003 e 6/5/2003 (Viana do Castelo)
entre 6/3/2003 e 13/5/2003 (Sines)

Campanha de Verão - entre 28/5/2003 e 15/7/2003 (Porto)
entre 30/5/2003 e 25/7/2003 (Viana do Castelo e Sines)

Para cada monitor, exposto em amostradores plásticos, colocaram-se três réplicas de campo, em todas as exposições.

A casca inteira era exposta em pedaços de aproximadamente 1.2 g. Dentro de cada rede de malha laxa expunham-se três pedaços. O líquene no substrato era exposto num pedaço só. Após recolha e limpeza tomavam-se réplicas de acordo com a quantidade de material obtida.

2.1.5. Recolha e Limpeza dos biomonitores

Utilizou-se a espécie de líquene foliáceo *Parmelia caperata* (L.) Ach., recolhida em pinheiro de zonas não poluídas do concelho de Baião (distrito do Porto). Considerou-se que a zona não era poluída, por apresentar uma flora natural líquénica que incluía todas as espécies do género *Lobaria* sp, existentes em Portugal, e descritas na literatura como muito sensíveis à poluição (Hawksworth e Rose, 1970).

O líquene no substrato não sofreu nenhum processo de limpeza, tendo sido exposto tal como foi recolhido.

Para obtenção do líquene destacado e moído, o líquene foi removido do substrato ao qual se encontrava agarrado, e limpo, tanto quanto possível, de todo o material externo (terra, insectos), com a ajuda de pinça e bisturi, sob uma lupa binocular. A limpeza incluiu dois ciclos de lavagem, de aproximadamente cinco minutos cada, em água desionizada, com agitação (agitador Jenway 1000).

Houve o cuidado de apenas seleccionar as zonas do talo que não apresentassem sinais de senescência ou ataque por fungos, para garantir que o material obtido provinha apenas de líquenes saudáveis.

O material assim obtido foi dividido em dois lotes:

- material que foi cortado em formas geométricas rectangulares, com ajuda de pinça e bisturi, sob uma lupa binocular - líquene destacado.
- material que foi liofilizado e moído em Moinho de Teflon (por imersão em azoto líquido) para obtenção de biomassa. O processo de preparação completava-se com uma passagem por um peneiro de nylon de porosidade 125 μm , para controlo do tamanho das partículas, seguida de homogeneização – líquene moído.

O processo de liofilização e moagem decorria no ITN, Lisboa.

A quantificação da área do amostrador, ocupada pelo líquene destacado, cortado em formas rectangulares, implicou a determinação da espessura do talo liquénico.

Rectângulos de líquene destacado foram cortados em, aproximadamente, dez secções. Essas secções foram colocadas numa lâmina com micrómetro e, ao microscópio, determinou-se a espessura de cada secção considerada. A espessura média obtida foi de 0.03 mm.

As restantes dimensões (largura e comprimento) foram obtidas com o uso de uma craveira.

Utilizaram-se cascas de plátano (*Platanus hybrida* Brot.), recolhidas na mesma zona de Baião em que se recolhia o líquene. A espessura da casca recolhida era de 2 mm, sensivelmente.

O material foi dividido em dois lotes:

- cascas que foram expostas tal como foram recolhidas – casca inteira.
- cascas que sofreram o processo de liofilização e moagem, usando o processo descrito para líquenes – casca moída.

Esta espécie tem pouca abundância natural de flora epifítica, é fácil de remover, apresenta uma espessura sensivelmente constante, sendo fácil de standardizar, e encontra-se presente em todo o país, vantagens que fizeram com que neste estudo fosse utilizada.

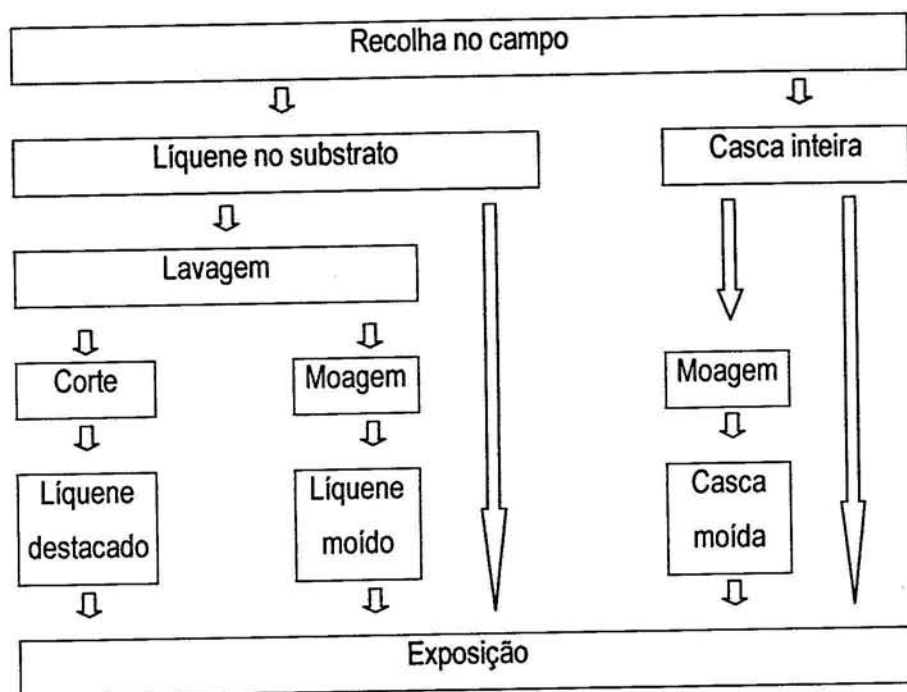


Figura 2.4. Sequência de obtenção das cinco formas de biomonitores expostos.

2.1.6. Resina Chelex 100 na forma Na⁺ e Acetato de Celulose

Expôs-se resina Chelex 100, na forma Na⁺, da Bio-Rad e acetato de celulose da Sigma. Para a exposição destes monitores não se realizou nenhum tipo de tratamento, sendo colocados nos amostradores plásticos, na forma granulada, tal como foram adquiridos.

2.2. Tratamento e Análise das Amostras

2.2.1. Reagentes e Material

Os reagentes usados no tratamento e análise das amostras eram da Merck e Panreac (grau p.a.). Todo o material utilizado era previamente descontaminado, durante 24h em HNO₃ p.a. a 20% (v/v), sendo depois abundantemente lavado com água desionizada.

2.2.2. Tratamento das amostras

Os monitores expostos em amostradores plásticos, foram colocadas a secar à temperatura ambiente, de um dia para o outro, a fim de perderem a humidade e, conseqüentemente, serem mais facilmente manuseados. Seguidamente, com ajuda de bisturi e pinça, recortavam-se as duas telas pelo diâmetro interno do aro de plástico, por forma a descartar a porção de material que tivesse ficado presa debaixo do aro, logo não exposta. Verificou-se que na zona periférica, junto ao aro, se acumulava maior quantidade de detritos grosseiros. Quando estes detritos eram muito grandes retiravam-se previamente, com a ajuda de uma pinça. Seguidamente, o material foi separado das telas que o envolviam.

O líquene no substrato foi limpo tal como descrito em 2.1.5 e a casca inteira foi moída tal como descrito em 2.1.5.

2.2.3. Digestão

Os monitores foram secos na estufa a 80°C, durante 24 horas, período após o qual se procedeu à sua digestão.

Os monitores, excepto a resina, foram colocados em vasos Teflon e digeridos com 4 ml de HNO₃/HF (3:1). Para isso utilizou-se o seguinte programa de microondas (Milestone, modelo MLS-1200 Mega): 5 minutos a 250 W, 5 minutos a 400 W e 5 minutos a 500 W. A solução obtida foi diluída a 10 ml, com água desionizada.

Soluções de água desionizada, com a mesma proporção de ácido, foram processadas conjuntamente com as amostras.

Para cada análise efectuada, porções de Material de Referência de IAEA 336 (líquene *Evernia prunastri* (L.) Ach.) da International Atomic Energy Agency (Stone *et al.*, 1995) foram processadas juntamente com as amostras a fim de garantir a exactidão dos resultados obtidos.

Neste estudo não foram utilizados materiais de referência de casca de árvores, embora a sua matriz seja diferente da líquénica.

As resinas Chelex 100 não são digeríveis neste programa de microondas, pelo que se procedia a uma extracção em banho frio, com HNO₃ 2M, em agitação, durante 30 minutos (Figura e McDuffie, 1980; Boniforti, 1984; Gomes, 1999), seguida de diluição a um volume final de 10 ml e centrifugação a 4000 rpm, durante 4 min (centrífuga JP Selecta – Mix Tasel), para evitar que ocorresse aspiração das resinas pelo tubo do espectrofotómetro.

Para cada exposição efectuada (Inverno, Primavera e Verão), porções de material não exposto foram analisadas, a fim de quantificar o teor em metais no material aquando da sua exposição.

O líquene no substrato e o líquene destacado eram digeridos no microondas sem necessidade de moagem prévia. Por esse facto, para o biomonitor líquene, foi feita a avaliação do teor em líquene inteiro e líquene moído. Um teste t-student permitiu comparar os teores obtidos em líquene inteiro e líquene moído não expostos.

Já no caso da casca, independentemente de esta ser exposta moída ou inteira, havia sempre necessidade de se proceder à sua moagem para digestão no microondas. Assim, a quantificação dos elementos no biomonitor não exposto foi feita sempre em casca moída.

2.2.4. Análise

Os monitores foram analisados por espectrofotometria de absorção atómica (espectrofotómetro Philips, modelo PU 9200X), com chama de ar/acetileno, para Pb, Cu e Ni e chama de acetileno/protóxido de azoto para Sr seguindo as condições descritas na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Condições de funcionamento do espectrofotómetro.

	Comprimento de onda (nm)	Taxa de gás (L min ⁻¹)	Passo de Banda (nm)	Correcção de fundo	Corrente da Lâmpada (mA)
Pb	217.0	1.0 (C ₂ H ₂ /Ar)	0.2	off	5
Cu	324.8	0.9(C ₂ H ₂ /Ar)	0.2	off	5
Ni	232.0	0.9(C ₂ H ₂ /Ar)	0.2	on	7
Sr	460.7	4.2 (C ₂ H ₂ /N ₂ O)	0.2	off	12

Para o líquene no substrato, apenas se obteve uma réplica nas exposições de Porto-Inverno Porto-Primavera e Viana-Primavera. Obtiveram-se duas réplicas para a exposição Sines-Primavera. Nas exposições de Verão utilizaram-se três réplicas.

Na análise da casca inteira apenas se obtiveram réplicas (três) nas exposições de Verão e Sines-Primavera.

Para a casca moída apenas se obtiveram duas réplicas em Sines-Verão.

Todas as outras análises foram efectuadas com três réplicas.

As concentrações obtidas com monitores expostos e não expostos foram comparadas recorrendo a um teste t-student, para $P = 0.1$, $P = 0.05$ e $P = 0.01$.

2.2.5. Optimização do método de digestão e análise

Inicialmente prepararam-se padrões com 4 ml de HNO_3/HF (3:1), digeridos em microondas, mas constatou-se que as rectas de calibração obtidas não eram estatisticamente diferentes das obtidas com padrões aquosos não digeridos em microondas ($P = 0.05$). O mesmo está em concordância com os dados obtidos por Tavares (1998), usando os mesmos espectrofotómetro e microondas. Assim, os padrões utilizados para o Pb, Ni e Cu não sofreram este tratamento, sendo apenas acidificados com HNO_3 p.a. a 3% (v/v).

No caso do Sr constatou-se que a matriz interferia no sinal de absorvância obtido, devido à presença de quantidades significativas de elementos alcalinos e alcalino-terrosos. Por esse motivo procedeu-se ao método de Adição de Padrão para obter uma recta de calibração. Porções do Material de Referência IAEA 336 eram digeridas no microondas usando o mesmo programa e quantidades de ácido. A adição do padrão de Sr era feita posteriormente.

Por este ser um método que consome grande quantidade de material, tentou-se obter uma recta de calibração menos morosa:

- adicionou-se, aos padrões de Sr, padrões de elementos alcalinos e alcalino-terrosos (K, Na, Ca e Mg) em concentração final igual à que se registaria no material de referência digerido,
- procedeu-se à adição de NaCl a 0.1% (m/v), quer aos padrões quer ao material de referência, seguindo as indicações do fabricante do espectrofotómetro.

As rectas de calibração obtidas nestas duas abordagens foram ambas estatisticamente iguais mas com declive estatisticamente diferente ($P = 0.05$) do declive obtido pelo método de adição de padrão.

Por essa razão o método de adição de padrão foi o escolhido.

Apresentam-se de seguida os parâmetros das rectas de calibração, obtidas para os quatro elementos em estudo. O limite de detecção, considerado como a concentração mais baixa que pode ser determinada como estatisticamente diferente do branco, foi calculado usando a definição proposta pela International Union of Pure and Applied Chemistry (Long e Winefordner, 1983):
 Limite detecção = $3 \cdot s_{xy}$.

Tabela 2.2. Rectas de calibração obtidas para Pb, Cu e Ni usando padrões aquosos acidificados e, em baixo, rectas obtidas para Sr, pelo método de adição de padrão.

	Pb	Cu	Ni
declive	4.8×10^{-2}	1.2×10^{-1}	6.9×10^{-2}
ordenada na origem	1.5×10^{-3}	7.1×10^{-4}	3.7×10^{-4}
coeficiente correlação	0.9993	0.9999	0.9993
Limite detecção (mg L ⁻¹)	0.089	0.012	0.044

Sr	Acetato	Casca moída	Líquene inteiro	Líquene moído	Resina
declive	0.1956	0.3209	0.3099	0.3166	0.3949
ordenada na origem	0.0014	-0.0077	-0.0006	-0.003	-0.0248
coeficiente correlação	0.9997	0.9964	0.9999	0.9997	0.9901
Limite detecção (mg L ⁻¹)	0.035	0.23	0.011	0.039	0.22

A escolha do programa de microondas e reagentes a usar baseou-se na comparação dos resultados da utilização de HNO₃ (4 ml) (Tavares, 1998) e os resultados da utilização de um programa de 5 minutos a 300 W (Milestone Application Note, 1990).

Optou-se pelo programa e reagentes referidos atrás por conduzirem a uma menor quantidade de resíduos da digestão, potencialmente perigosos para o tubo de aspiração do espectrofotómetro, uma vez que os resultados não indicavam diferença estatística (teste t-student, para P = 0.05) entre as médias obtidas nos quatro tratamentos.

Na tabela 2.3. podem ver-se os resultados obtidos para o Cu e Pb. Os valores certificados do Material de Referência encontram-se descritos na tabela 2.4.

Tabela 2.3. Comparação dos valores médios^b obtidos para diferentes programas de microondas e diferentes reagentes de digestão, usando o Material de Referência IAEA 336.

Elemento	Reagentes	Valor médio ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	Programa
Cu	4 ml HNO ₃	3.5 ± 0.3 ₍₃₎	5 min a 250 W, 5 min a 400 W e 5 min a 500 W
	3 ml HNO ₃ + 1 ml HF	3.7 ± 0.2 ₍₃₎	
Pb		5.2 ± 0.1 ₍₃₎	5 min a 300 W
	3 ml HNO ₃ + 1 ml HF	5.1 ± 0.3 ₍₃₎	5 min a 250 W, 5 min a 400 W e 5 min a 500 W

^aexpresso em peso seco; ^bconcentração média ± desvio padrão; o número de réplicas é dado entre parêntesis, cada réplica foi analisada 3 vezes.

As condições de funcionamento do espectrofotômetro foram otimizadas, tendo em conta os valores publicados para o Material de Referência (Stone *et al.*, 1995) e as características do próprio aparelho (Whiteside e Milner, 1984). Um teste t-student ($P = 0.05$), permitiu comparar os resultados obtidos com os valores certificados, sem que se registassem diferenças significativas.

Tabela 2.4. Comparação dos valores médios^b obtidos e valores de concentração^c certificados, usando o Material de Referência IAEA 336.

Elemento	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	Valor obtido ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a
Pb	4.9 ± 0.6	5.1 ± 0.3 ₍₃₎
Cu	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.2 ₍₃₎
Ni	NÃO DESCRITO	1.2 ± 0.15 ₍₃₎
Sr	9.3 ± 1.1	9.2 ± 0.8 ₍₅₎

^aexpresso em peso seco; ^bconcentração média ± desvio padrão; ^cconcentração média ± intervalo de confiança; o número de réplicas é dado entre parêntesis, cada réplica foi analisada 3 vezes.

2.3. Controlo de vitalidade do líquene inteiro e moído

2.3.1. Parâmetros fisiológicos avaliados: potássio e pigmentos fotossintéticos

Optou-se por quantificar o teor em potássio, como indicador da manutenção da vitalidade celular, uma vez que este é um dos elementos mais abundante nas células, que se desloca através da

membrana celular usando sistemas de transporte proteicos. A danificação da integridade da membrana celular contribui para a morte da célula por desregulação osmótica e/ou electrónica. A manutenção de um teor em potássio, constante durante o tempo de exposição à atmosfera, constituiria uma indicação de que a membrana celular não teria sido danificada.

Paralelamente determinou-se o teor em clorofilas *a* e *b*, bem como em carotenos totais. Sendo a fotossíntese uma via metabólica essencial, para a manutenção da vitalidade destes organismos, a degradação dos pigmentos fotossintéticos, que a ela estão associados, poderia ser interpretada como um sinal de senescência.

2.3.2. Exposição dos controlos

O controlo da vitalidade do material liquénico exposto realizou-se apenas no Porto, durante as três campanhas efectuadas. Aproximadamente 200 mg de líquene moído, 100 mg de líquene destacado (peso fresco) e líquenes agarrados ao substrato, eram expostos nas mesmas condições que os restantes monitores que se destinavam à análise de metais, tal como descrito em 2.1.3.

2.3.3. Análise de pigmentos fotossintéticos

Amostradores, contendo líquene moído e destacado, e uma rede de malha laxa contendo líquene no substrato, foram removidos semanalmente, durante os dois meses em que decorria a exposição. O líquene no substrato era limpo, tal como descrito em 2.1.5.

O material obtido foi posto a secar de um dia para o outro à temperatura ambiente. De cada amostrador tomavam-se três réplicas, para análise dos pigmentos fotossintéticos, de cerca de 25 mg para líquene moído, 12 mg para o líquene destacado e 20 mg para o líquene no substrato. O restante material era utilizado na análise de potássio.

O protocolo utilizado foi adaptado de Pfeifhoffer *et al.* (2002). Os líquenes destacado e no substrato foram moídos, num almofariz, com adição de azoto líquido. Seguiu-se a adição de 10 ml de dimetil sulfóxido (DMSO), para o líquene no substrato, e 5 ml para o líquene destacado, para extracção de pigmentos fotossintéticos. Para o líquene moído a extracção foi feita com adição de 5 ml de DMSO, seguida de agitação no vórtex, durante aproximadamente 30s.

As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 5 min, a 20°C, em centrífuga Hettich Universal16R. O sedimento foi ressuspenso em 5 ml de DMSO, reagitado e de novo centrifugado, usando o mesmo programa.

O volume final era ajustado com DMSO a 25 ml, para líquenes moído e inteiro, e 10 ml para líquene destacado.

A determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos foi feita logo após o processo de extração.

A medição da absorvância foi feita em espectrofotômetro de feixe duplo, Jasco V-530, com uma resolução de 1 nm. As medições de absorvância foram realizadas para os comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm. Usaram-se as equações descritas por Wellburn (1994), para calcular as concentrações de clorofilas *a* e *b* e carotenos totais, que se encontram na tabela 2.5.

2.3.4. Optimização do método de extração dos pigmentos fotossintéticos

Numa primeira fase tentou-se otimizar a quantidade de material a utilizar e o solvente mais adequado à extração de fotopigmentos de líquene. Concretamente, utilizaram-se os protocolos descritos por Pfeifhoffer *et al.* (2002), comparando o desempenho de acetona 80%, etanol 90% e DMSO para extração de fotopigmentos de líquene.

Os protocolos, que se utilizaram para estes solventes orgânicos, foram em tudo iguais ao atrás descrito para o DMSO. As medições de absorvância foram realizadas para os comprimentos de onda de 663, 646 e 470 nm, para ambos os solventes.

Na tabela 2.5. apresentam-se as fórmulas usadas no cálculo da concentração de pigmentos fotossintéticos, a partir das absorvâncias medidas, para os diferentes solventes utilizados.

Tabela 2.5. Equações utilizadas no cálculo das concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenos totais (adaptado de Valle-Tascón, 1994; Wellburn, 1994 e Pfeifhoffer *et al.*, 2002).

Solvente	Equação
DMSO	$C_a = 12.19A_{665} - 3.45A_{649}$ $C_b = 21.99A_{649} - 5.32A_{665}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 2.14C_a - 70.16C_b)/220$
Acetona 80% e Etanol 90%	$C_a = 12.21A_{663} - 2.81A_{646}$ $C_b = 20.13A_{646} - 5.03A_{663}$ $C_{x+c} = (1000A_{470} - 3.27C_a - 104C_b)/198$

C_a – clorofila *a*; C_b – clorofila *b*; C_{x+c} – carotenos totais

Quer para líquene moído, quer para líquene inteiro, os melhores resultados de absorvância foram obtidos usando DMSO, sendo que no primeiro caso o teor de clorofilas obtido foi aproximadamente o triplo do que se obteve usando quer etanol, quer acetona, enquanto que para o segundo, o teor obtido foi quase o dobro. Por essa razão, o DMSO foi o solvente escolhido para a extracção dos fotopigmentos.

Tabela 2.6. Comparação dos teores ($\mu\text{g ml}^{-1}$)^a de fotopigmentos obtidos, usando acetona (80%), etanol (90%) e DMSO, extraídos de 100 mg de líquene moído e 50 mg de líquene inteiro. As equações usadas para determinar a concentração estão descritas na tabela 2.5.

Líquene moído	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	carotenos totais
Acetona (80%)	2.3	1.0	1.3
Etanol (90%)	2.9	1.2	1.4
DMSO	7.9	3.5	1.8

Líquene inteiro	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	carotenos totais
Acetona (80%)	0.7	0.4	0.3
Etanol (90%)	0.5	0.2	0.2
DMSO	1.9	1.1	0.5

^aconcentração média de três réplicas

Os pesos das amostras utilizadas variaram entre os 40 e os 100 mg (peso fresco), tendo-se optado, posteriormente, por reduzir a quantidade de material utilizada, uma vez que isso não implicava prejuízo das absorvâncias medidas.

Determinações parciais de absorvância, mostraram que o teor obtido com a primeira centrifugação era, geralmente, superior a 95% do total. Assim, optou-se por realizar duas centrifugações, o que permitia garantir uma extracção de pigmentos praticamente completa sem que os extractos finais se apresentassem muito diluídos.

2.3.5. Análise de potássio

O material não utilizado para quantificação de pigmentos fotossintéticos, era posto a secar na estufa, a 80°C, durante 4 horas. Após isso tomavam-se três réplicas para quantificação do teor em potássio, de, sensivelmente, 6 mg para líquene moído e no substrato e 3 mg para o líquene destacado.

As amostras eram digeridas a quente, com 1 ml HNO₃ p.a., durante 30 minutos, sendo posteriormente diluídas a 25 ml com água desionizada. A determinação dos níveis de potássio foi feita recorrendo a um fotómetro de chama Jenway.

Tal como para as análises efectuadas por espectrofotometria de absorção atómica, porções do material de referência IAEA 336 eram analisadas a cada duas semanas, juntamente com as amostras, para garantir a exactidão do método.

Na tabela 2.7. pode ver-se a comparação entre os teores obtidos e o valor certificado no material de referência.

Tabela 2.7. Comparação dos valores médios^b obtidos e valores de concentração^c certificados, usando o Material de Referência IAEA 336.

Elemento	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	Valor obtido ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a
K	1840 \pm 200	1834 \pm 67 ⁽⁵⁾

^aexpresso em peso seco; ^bconcentração média \pm desvio padrão; ^cconcentração média \pm intervalo de confiança; o número de réplicas é dado entre parêntesis, cada réplica foi analisada 3 vezes.

3. Resultados



3.1. Resultados quantitativos da exposição atmosférica

Na tabela 3.1. apresentam-se os teores obtidos para os biomonitores e monitores sintéticos não expostos (controlos) à atmosfera e os resultados da comparação dos teores obtidos para líquene inteiro (no substrato e destacado) e líquene moído, através de um teste t-student.

Nas tabelas 3.2. a 3.4. apresentam-se os resultados obtidos nas três campanhas de exposição realizadas, bem como a comparação entre os valores dos controlos e os obtidos para biomonitores e monitores sintéticos.

Da análise da tabela 3.1. pode ver-se que, para o monitor sintético acetato de celulose, não se conseguiu determinar nenhum elemento no material não exposto. O mesmo aconteceu para o biomonitor casca, em relação ao chumbo. Por esse facto não se realizou a comparação entre os valores de controlo e obtidos, tendo-se considerado que ocorreu acumulação sempre que o valor obtido na análise foi superior ao limite de detecção.

Da mesma forma, sempre que não se conseguiu detectar um elemento, num monitor que apresentava concentrações mensuráveis desse elemento no controlo, considerou-se que houve perda de teor.

Nas figuras 3.1 a 3.4. podem ver-se os teores acumulados pelos diferentes monitores, nas três exposições efectuadas.

Tabela 3.1. Teores (em peso seco) obtidos na quantificação dos controlos.

Biomonitores e monitores sintéticos não expostos					
	Ld	teor	dp	dpr	
	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	(%)	
Cu	1.60	13.82 ₍₉₎	3.46	25.02	Líquene no substrato e destacado
	0.64	14.49 ₍₉₎	3.25	22.43	Líquene moído
	0.40	5.86 ₍₈₎	1.05	17.85	Casca moída e inteira
	0.40	<Ld ₍₆₎	ND	ND	Acetato de Celulose
	0.20	0.73 ₍₄₎	0.15	20.14	Resina
Ni	4.50	9.97 _{(9)**}	2.43	24.33	Líquene no substrato e destacado
	3.53	6.46 _{(8)**}	1.58	24.51	Líquene moído
	1.13	1.55 ₍₆₎	0.41	26.28	Casca moída e inteira
	1.13	<Ld ₍₆₎	ND	ND	Acetato de Celulose
	0.56	1.28 ₍₅₎	0.27	21.41	Resina
Pb	8.90	11.64 ₍₉₎	2.18	18.62	Líquene no substrato e destacado
	3.56	9.36 ₍₈₎	3.65	38.99	Líquene moído
	2.23	<Ld ₍₉₎	ND	ND	Casca moída e inteira
	2.23	<Ld ₍₆₎	ND	ND	Acetato de Celulose
	1.11	1.45 ₍₅₎	0.33	22.85	Resina
Sr	3.70	6.23 ₍₆₎	1.11	17.88	Líquene no substrato e destacado
	1.12	7.14 ₍₅₎	1.09	15.19	Líquene moído
	1.45	105.80 ₍₄₎	17.27	16.32	Casca moída e inteira
	0.87	<Ld ₍₄₎	ND	ND	Acetato de Celulose
	1.75	12.95 ₍₅₎	1.97	15.25	Resina

Legenda: Ld – Limite de detecção; dp – desvio padrão; dpr – desvio padrão relativo; ND – não determinado; o número de réplicas é dado entre parêntesis, cada réplica foi analisada três vezes; ** diferença significativa para P = 0.05.

Tabela 3.2. Comparação dos teores^a ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) obtidos na quantificação dos biomonitores e monitores sintéticos nas exposições realizadas no Porto.

	Não exposto	Porto Inverno		Porto Primavera		Porto Verão		Monitor exposto
	teor	teor	dpr	teor	dpr	teor	dpr	
Cu	13.82	33.54	ND	29.85	ND	32.61***	12.61	Líquene no substrato
	13.82	18.03*	15.25	26.18***	7.38	16.52	25.61	Líquene destacado
	14.49	11.35	2.35	15.97	3.64	19.23**	3.49	Líquene moído
	5.86	5.70	5.35	7.96**	25.03	8.89***	8.13	Casca moída
	5.86	ND	ND	ND	ND	7.10/7.81/40.62	>100%	Casca inteira
	<Ld	4.16	16.58	3.53	6.63	1.65	15.24	Acetato de celulose
	0.73	2.05***	19.37	1.67***	4.34	1.51**	25.04	Resina
Ni	9.97	5.54	ND	14.30	ND	18.66***	13.66	Líquene no substrato
	9.97	25.19***	28.98	14.66**	20.95	15.78***	11.65	Líquene destacado
	6.46	45.38***	18.77	4.25●●	8.79	3.53●●	13.78	Líquene moído
	1.55	6.67***	2.36	6.85***	39.92	3.93***	23.56	Casca moída
	1.55	ND	ND	ND	ND	3.25***	13.61	Casca inteira
	<Ld	3.23	5.65	2.56	11.20	1.72	5.39	Acetato de celulose
	1.28	1.48	9.63	2.13***	4.18	1.73*	18.06	Resina

Tabela 3.2. (continuação)

	Não exposto	Porto Inverno		Porto Primavera		Porto Verão		Monitor exposto
	teor	teor	dpr	teor	dpr	teor	dpr	
Pb	11.64	16.16	ND	19.26	ND	31.33***	23.77	Líquene no substrato
	11.64	39.66***	7.08	19.14**	41.79	33.50***	14.98	Líquene destacado
	9.36	9.88	5.42	7.35/7.06/72.80	>100%	13.65	21.41	Líquene moído
	<Ld	13.30	25.75	<Ld	ND	3.96	19.58	Casca moída
	<Ld	ND	ND	ND	ND	13.64	22.37	Casca inteira
	<Ld	<Ld	ND	<Ld	ND	<Ld	ND	Acetato de celulose
	1.45	1.31	53.17	1.71	21.28	2.55***	11.84	Resina
Sr	6.23	15.10	ND	6.29	ND	10.76***	3.06	Líquene no substrato
	6.23	19.86***	15.82	7.76*	15.04	11.05***	16.89	Líquene destacado
	7.14	11.76***	5.37	8.95**	6.71	6.39	3.71	Líquene moído
	105.80	23.50●●●	2.60	101.42	5.12	103.29	3.01	Casca moída
	105.80	ND	ND	ND	ND	52.14●●●	22.71	Casca inteira
	<Ld	13.34	7.86	<Ld	ND	<Ld	ND	Acetato de celulose
	12.95	<Ld	ND	13.20	1.48	15.28	4.31	Resina

Legenda: dpr – desvio padrão relativo, em %; Ld – Limite de detecção; ND – não determinado; *concentração média obtida com três réplicas, cada uma analisada três vezes; para dpr maiores que 100% indicam-se as três medições efectuadas.

*** acumulação significativa para P = 0.01

** acumulação significativa para P = 0.05

* acumulação significativa para P = 0.1

●●● diminuição significativa para P = 0.01

●● diminuição significativa para P = 0.05

Tabela 3.3. Comparação dos teores^a ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) obtidos na quantificação dos biomonitores e monitores sintéticos nas exposições realizadas em Viana do Castelo.

	Não exposto	Viana Primavera		Viana Verão		Monitor exposto
	teor	teor	dpr	teor	dpr	
Cu	13.82	15.50	ND	28.15***	8.69	Líquene no substrato
	13.82	15.39	4.86	22.23***	20.31	Líquene destacado
	14.49	13.11	3.86	19.60**	4.54	Líquene moído
	5.86	5.30	12.52	6.86	24.54	Casca moída
	5.86	ND	ND	8.00***	6.58	Casca inteira
	<Ld	2.27	50.48	1.34	32.09	Acetato de celulose
	0.73	1.20***	16.12	0.95	5.75	Resina
	Ni	9.97	12.26	ND	17.18***	23.27
9.97		19.74***	21.39	14.55**	6.17	Líquene destacado
6.46		4.89	19.89	4.89	16.08	Líquene moído
1.55		4.83***	30.68	2.55**	25.62	Casca moída
1.55		ND	ND	2.43**	17.13	Casca inteira
<Ld		4.92	53.31	1.61	26.73	Acetato de celulose
1.28		2.53***	15.77	2.21**	23.17	Resina

Tabela 3.3. (continuação)

	Não exposto	Viana Primavera		Viana Verão		Monitor exposto
	teor	teor	dpr	teor	dpr	..
	11.64	12.28	ND	17.57***	17.06	Líquene no substrato
	11.64	26.83***	21.14	114.95/28.47/<Ld	>100%	Líquene destacado
	9.36	7.33	38.38	11.75	2.46	Líquene moído
Pb	<Ld	9.34	17.81	4.26	18.20	Casca moída
	<Ld	ND	ND	3.61	19.94	Casca inteira
	<Ld	<Ld	ND	<Ld	ND	Acetato de celulose
	1.45	<Ld	ND	1.18	25.28	Resina
	6.23	6.84	ND	114.22***	3.04	Líquene no substrato
	6.23	6.69	26.56	5.46	16.01	Líquene destacado
	7.14	12.20**	35.97	6.41	1.93	Líquene moído
Sr	105.80	101.66	5.71	104.11	12.46	Casca moída
	105.80	ND	ND	42.51●●●	12.69	Casca inteira
	<Ld	<Ld	ND	<Ld	ND	Acetato de celulose
	12.95	14.39	2.06	13.03	2.09	Resina

Legenda: dpr – desvio padrão relativo, em %; Ld – Limite de detecção; ND – não determinado; ^aconcentração média obtida com três réplicas, cada uma analisada três vezes; para dpr maiores que 100% indicam-se as três medições efectuadas.

*** acumulação significativa para P = 0.01

** acumulação significativa para P = 0.05

●●● diminuição significativa para P = 0.01

Tabela 3.4. Comparação dos teores^a ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) obtidos na quantificação dos biomonitores e monitores sintéticos nas exposições realizadas em Sines.

	Não exposto	Sines Primavera		Sines Verão		Monitor exposto
	teor	teor	dpr	teor	dpr	
Cu	13.82	16.64	3.43	12.51	19.13	Líquene no substrato
	13.82	21.75***	14.64	16.71	12.44	Líquene destacado
	14.49	19.69**	12.83	18.65*	7.22	Líquene moído
	5.86	7.01	13.51	4.18●●	20.91	Casca moída
	5.86	10.89***	21.24	6.74	5.94	Casca inteira
	<Ld	1.47	59.92	<Ld	ND	Acetato de celulose
	0.73	1.12/1.35/<Ld	>100%	1.54***	23.0	Resina
	9.97	6.42●	2.27	12.61	15.19	Líquene no substrato
Ni	9.97	19.82***	10.67	18.92***	3.28	Líquene destacado
	6.46	14.73***	28.58	7.13	11.07	Líquene moído
	1.55	8.33***	22.94	4.86***	8.42	Casca moída
	1.55	5.09***	2.47	4.41***	15.86	Casca inteira
	<Ld	2.83	4.81	1.58	11.89	Acetato de celulose
	1.28	6.37***	45.61	3.03***	12.12	Resina

Tabela 3.4. (continuação)

	Não exposto	Sines Primavera		Sines Verão		Monitor exposto
	teor	teor	dpr(%)	teor	dpr(%)	
Pb	11.64	16.23**	8.02	10.65	16.80	Líquene no substrato
	11.64	<Ld	ND	26.04***	15.27	Líquene destacado
	9.36	14.35*	31.0	21.84***	24.27	Líquene moído
	<Ld	<Ld	ND	6.58/<Ld	>100%	Casca moída
	<Ld	3.82	16.42	8.97	25.24	Casca inteira
	<Ld	<Ld	ND	<Ld	ND	Acetato de celulose
	1.45	2.40**	16.78	1.67	17.23	Resina
Sr	6.23	17.02***	2.51	15.92***	4.44	Líquene no substrato
	6.23	20.98***	21.86	6.33	16.85	Líquene destacado
	7.14	15.11***	19.60	7.39	3.23	Líquene moído
	105.80	115.28	6.13	109.27	1.47	Casca moída
	105.80	203.06**	33.47	287.72***	15.08	Casca inteira
	<Ld	7.91	39.56	<Ld	ND	Acetato de celulose
	12.95	16.68*	15.08	15.69	13.45	Resina

Legenda: dpr – desvio padrão relativo, em %; Ld – Limite de detecção; ND – não determinado; *concentração média obtida com três réplicas, cada uma analisada três vezes; para dpr maiores que 100% indicam-se as três medições efectuadas.

*** acumulação significativa para P = 0.01

** acumulação significativa para P = 0.05

* acumulação significativa para P = 0.1

●● diminuição significativa para P = 0.05

● diminuição significativa para P = 0.1

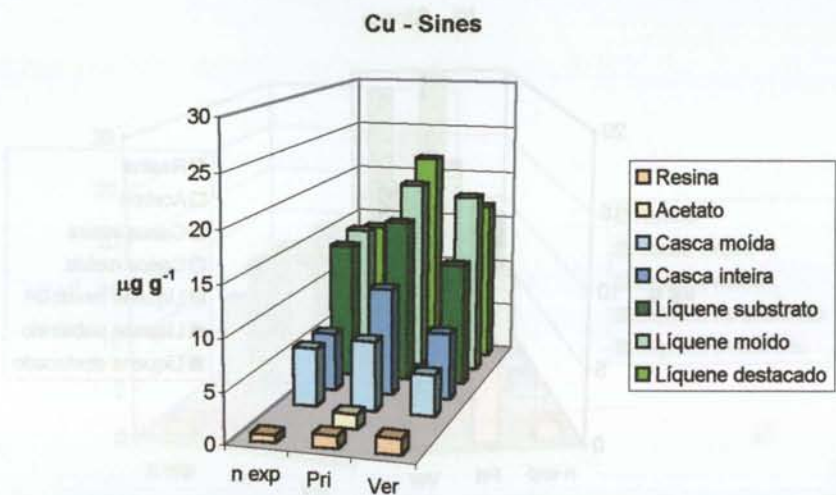
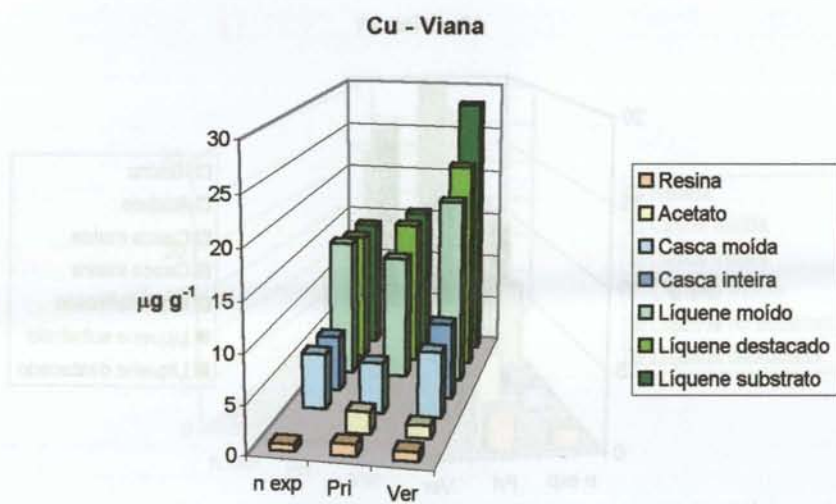
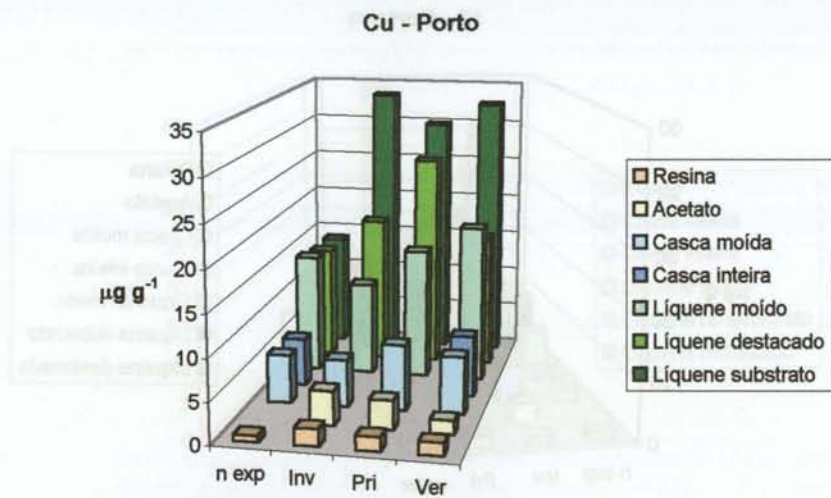


Figura 3.1. Acumulação de cobre no Porto, Viana do Castelo e Sines.

Legenda: n exp – não exposto; Inv – Inverno; Pri – Primavera; Ver – Verão.

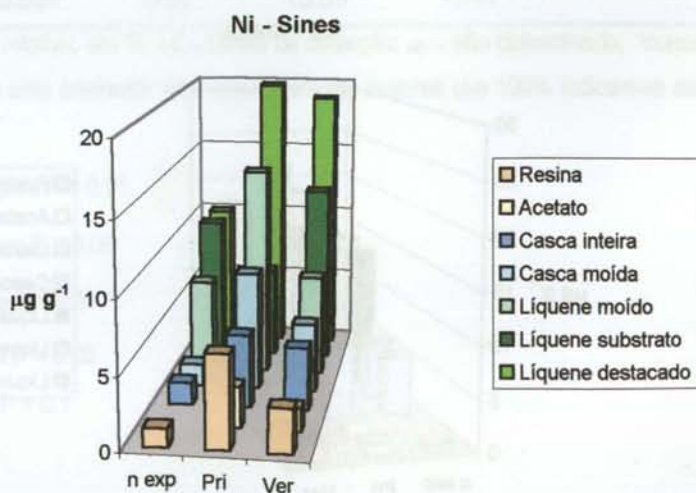
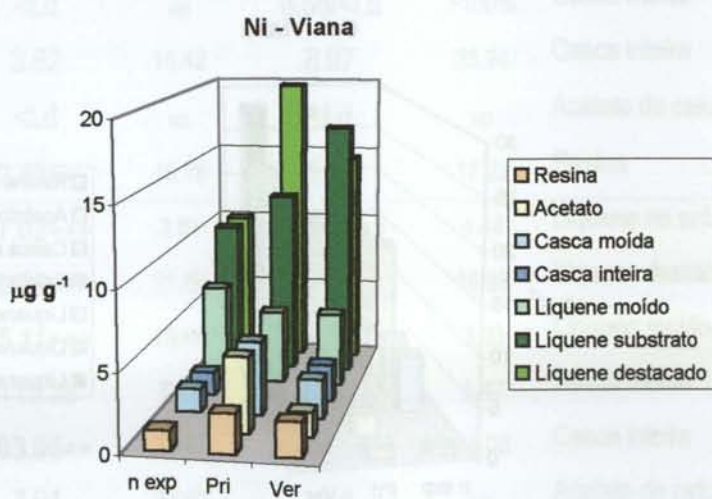
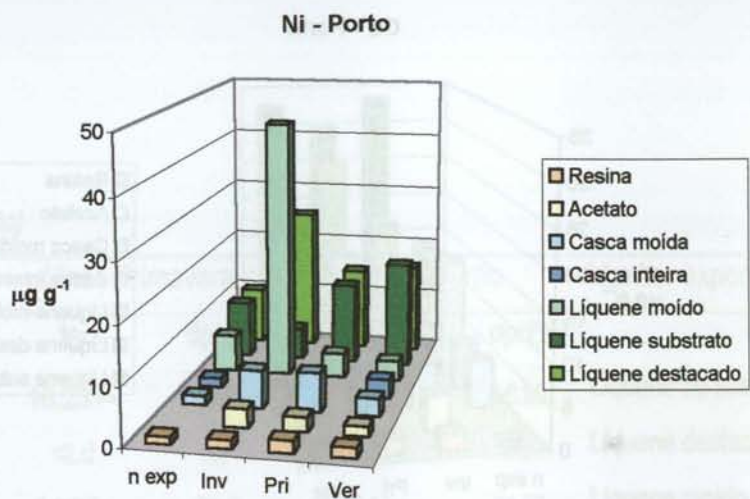


Figura 3.2. Acumulação de níquel no Porto, Viana do Castelo e Sines.

Legenda: n exp – não exposto; Inv – Inverno; Pri – Primavera; Ver – Verão.

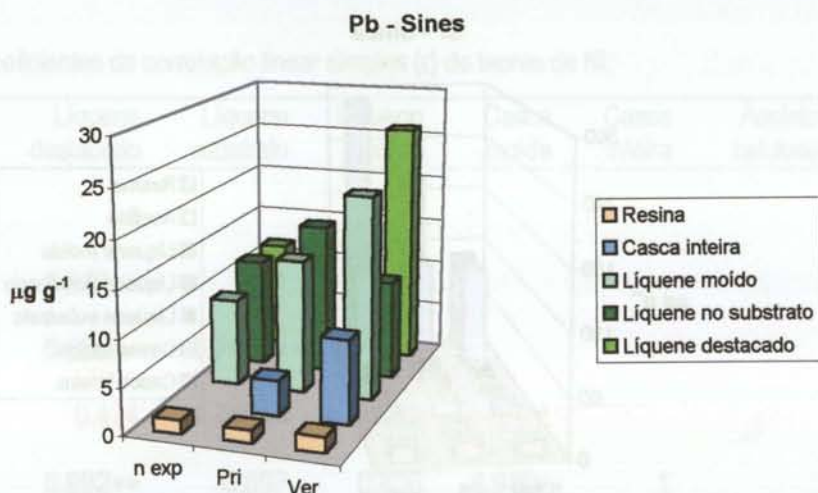
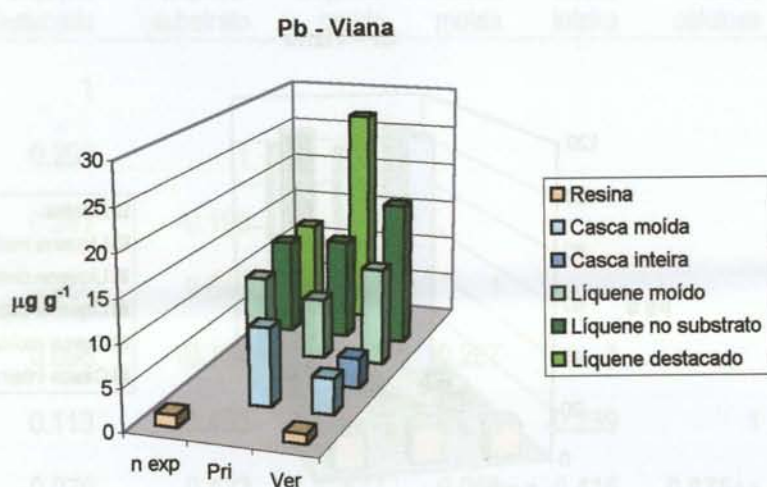
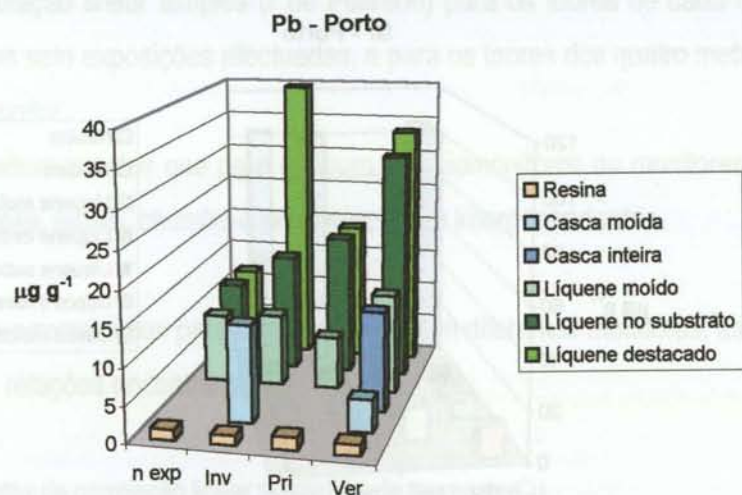


Figura 3.3. Acumulação de chumbo no Porto, Viana do Castelo e Sines.

Legenda: n exp – não exposto; Inv – Inverno; Pri – Primavera; Ver – Verão.

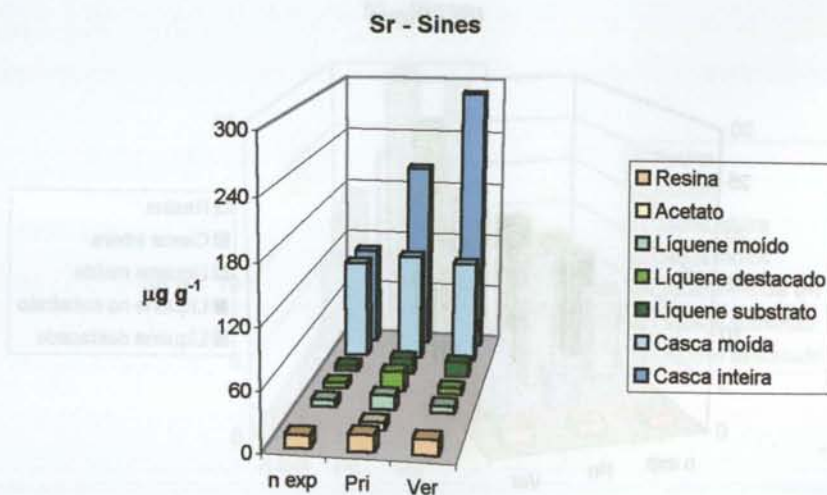
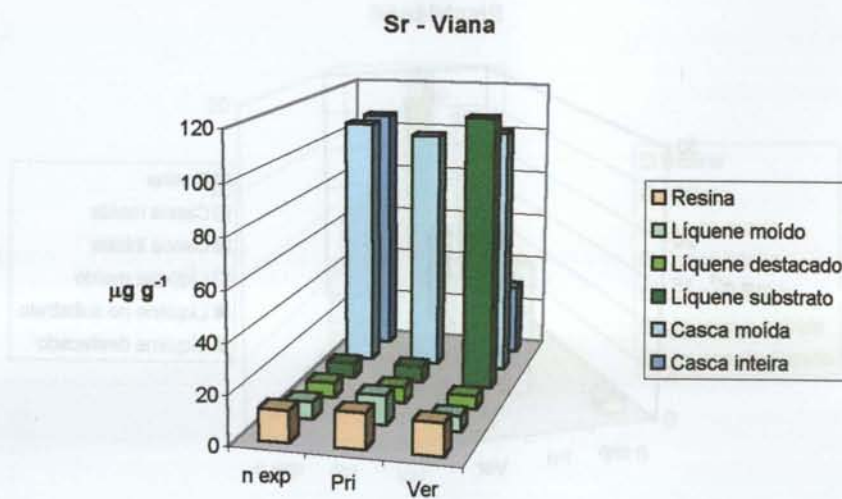
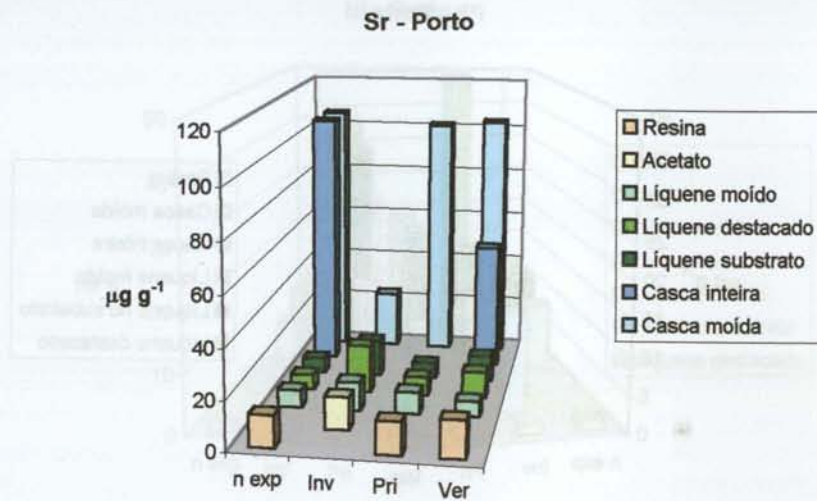


Figura 3.4. Acumulação de estrôncio no Porto, Viana do Castelo e Sines.

Legenda: n exp – não exposto; Inv – Inverno; Pri – Primavera; Ver – Verão.

Calculou-se a correlação linear simples (r de Pearson) para os teores de cada metal, obtidos pelos monitores, nas sete exposições efectuadas, e para os teores dos quatro metais em estudo obtidos por cada monitor.

Os resultados permitem concluir que para nenhum dos biomonitores ou monitores sintéticos as acumulações de cobre, níquel, chumbo e estrôncio, foram interdependentes.

No que diz respeito a correlações para o mesmo metal em diferentes monitores, as tabelas 3.5 a 3.8. apresentam as relações encontradas.

Tabela 3.5. Coeficientes de correlação linear simples (r) de teores de Cu.

	Líquene destacado	Líquene substrato	Líquene moído	Casca moída	Casca inteira	Acetato celulose	Resina
Líquene destacado	1						
Líquene substrato	0.291	1					
Líquene moído	0.241	-0.195	1				
Casca moída	0.454	0.649	0.350	1			
Casca inteira	0.698	-0.191	0.772	0.267	1		
Acetato celulose	0.113	0.435	-0.821**	-0.284	-0.239	1	
Resina	-0.079	0.423	-0.577	-0.061	-0.416	0.875**	1

**significativo a $P = 0.05$

Tabela 3.6. Coeficientes de correlação linear simples (r) de teores de Ni.

	Líquene destacado	Líquene substrato	Líquene moído	Casca moída	Casca inteira	Acetato celulose	Resina
Líquene destacado	1						
Líquene substrato	-0.859**	1					
Líquene moído	0.863**	-0.767**	1				
Casca moída	0.474	-0.789**	0.439	1			
Casca inteira	0.992**	-0.897	0.836	0.930*	1		
Acetato celulose	0.494	-0.463	0.228	0.336	0.704*	1	
Resina	0.091	-0.464	-0.099	0.566	0.826**	0.057	1

*significativo a $P = 0.1$; **significativo a $P = 0.05$

Tabela 3.7. Coeficientes de correlação linear simples (*r*) de teores de Pb.

	Líquene destacado	Líquene substrato	Líquene moído	Casca moída	Casca inteira	Resina
Líquene destacado	1					
Líquene substrato	0.242	1				
Líquene moído	-0.378	-0.106	1			
Casca moída	0.401	-0.612	-0.684	1		
Casca inteira	ND	0.628	0.264	ND	1	
Resina	-0.042	0.565	0.202	-0.449	0.501	1

Tabela 3.8. Coeficientes de correlação linear simples (*r*) de teores de Sr.

	Líquene destacado	Líquene substrato	Líquene moído	Casca moída	Casca inteira	Resina
Líquene destacado	1					
Líquene substrato	-0.313	1				
Líquene moído	0.668	-0.411	1			
Casca moída	-0.479	0.119	-0.182	1		
Casca inteira	0.186	-0.539	0.419	0.725	1	
Resina	0.728	-0.487	0.485	0.803	0.670	1

3.2. Resultados obtidos com o controlo de vitalidade

O controlo de vitalidade para as três formas de líquene expostas envolveu a determinação de teores de clorofila *a* e *b* e de carotenos totais, durante as três exposições realizadas no Porto. Apresentam-se, de seguida, espectros representativos das absorvâncias obtidas (figuras 3.5 a 3.10), no início e fim do período de exposição, bem como as concentrações de pigmentos determinadas (figuras 3.11 a 3.16).

Verificou-se, com um teste t-student, que os declives obtidos nas rectas de acumulação de fotopigmentos, não foram estatisticamente diferentes de zero, para $P = 0.05$, excepto para:

- teor em clorofila *a* e carotenos totais, do líquene moído, na exposição de Primavera,
- teor em clorofilas *a* e *b*, do líquene no substrato, e clorofila *a* do líquene moído, no Verão em que o declive negativo indica um decréscimo dos teores medidos ao longo da exposição.

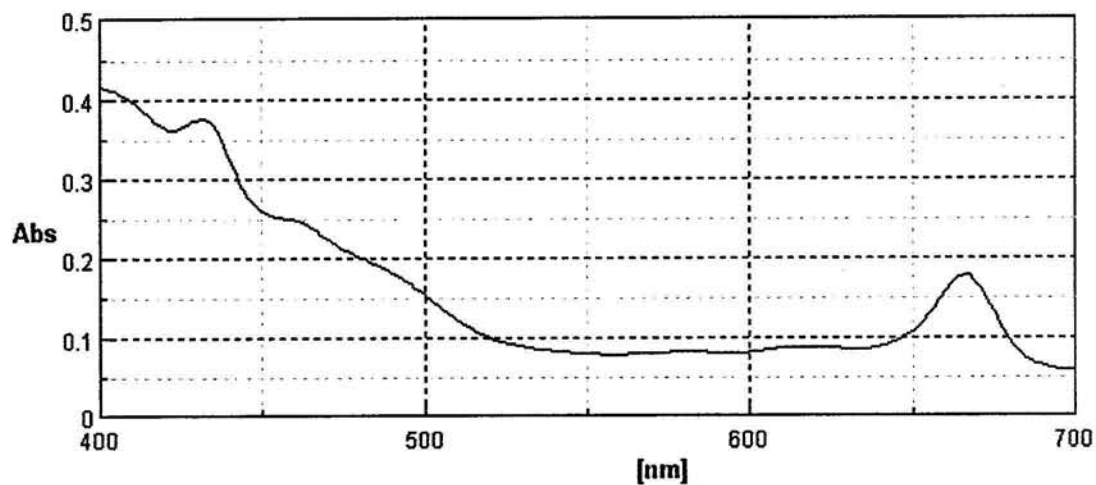


Figura 3.5. Espectro de absorvância, para o líquene destacado, no início da exposição.

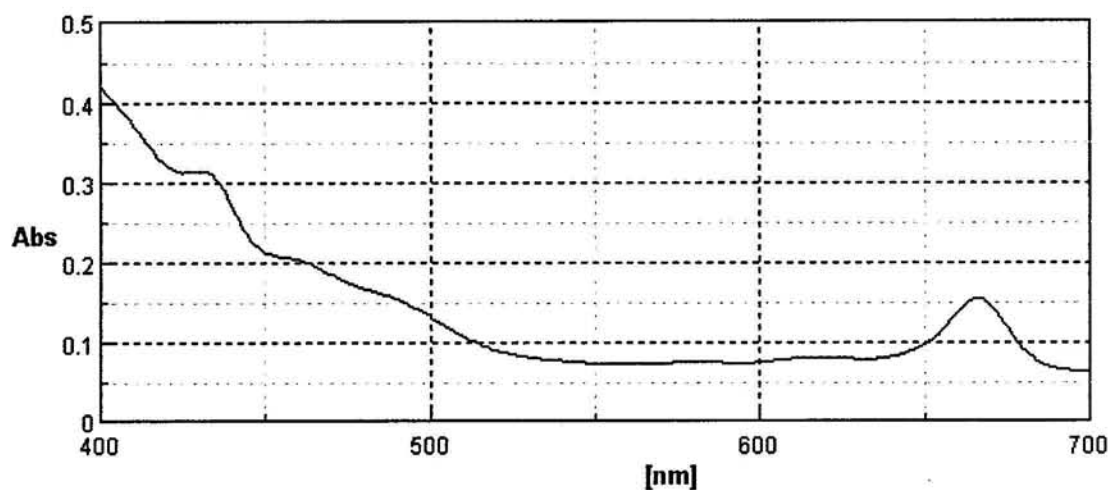


Figura 3.6. Espectro de absorvância, para o líquene destacado, no final da exposição.

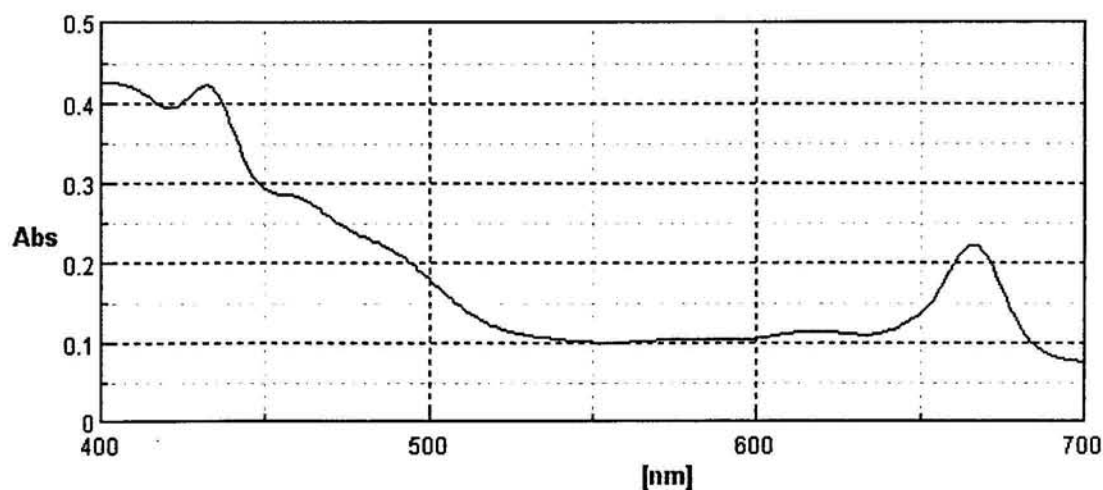


Figura 3.7. Espectro de absorvância, para o líquene no substrato, no início da exposição.

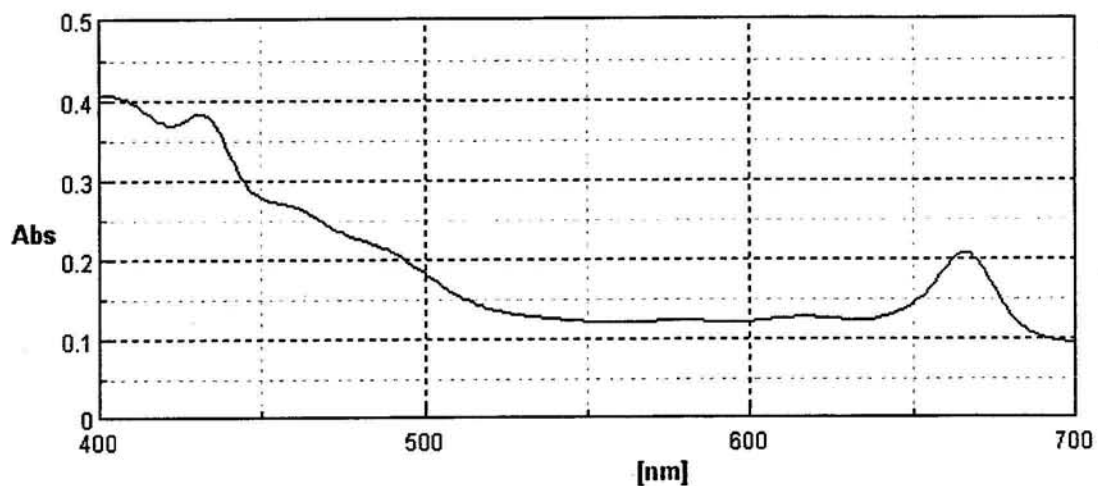


Figura 3.8. Espectro de absorvância, para o líquene no substrato, no final da exposição.

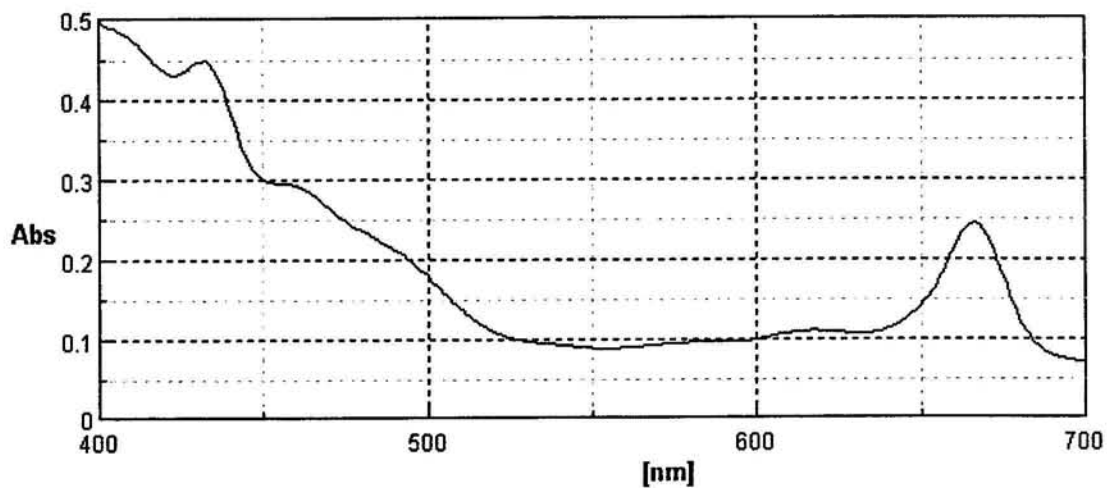


Figura 3.9. Espectro de absorvância, para o líquene moído, no início da exposição.

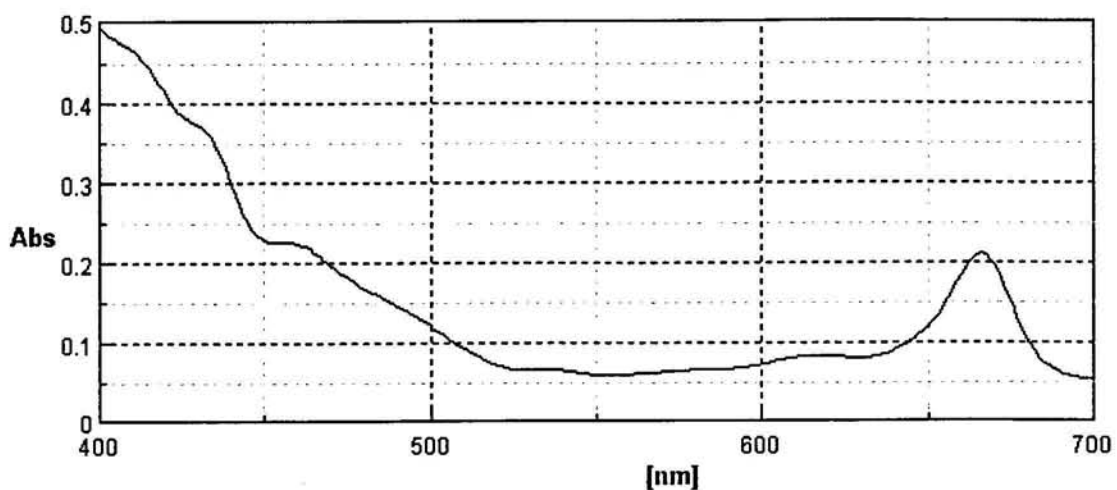


Figura 3.10. Espectro de absorvância, para o líquene moído, no final da exposição.

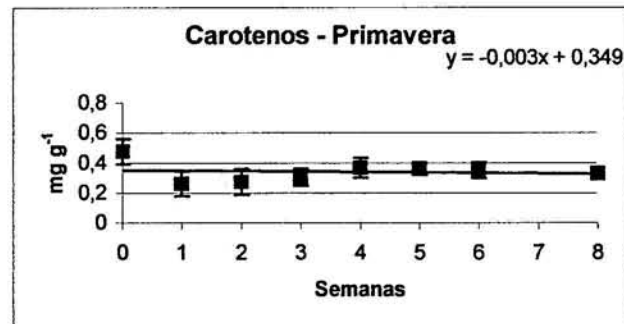
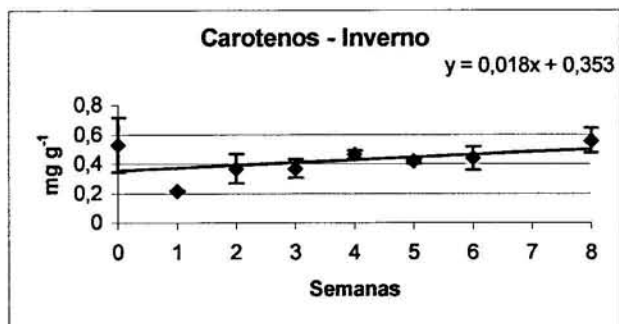
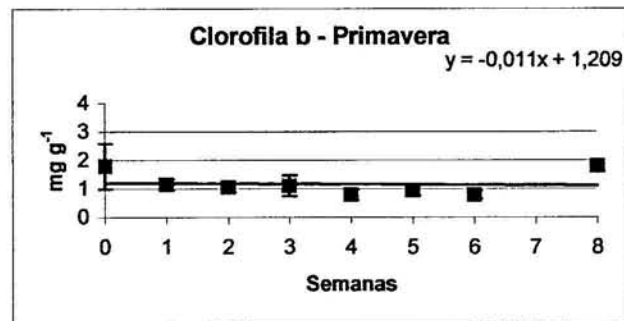
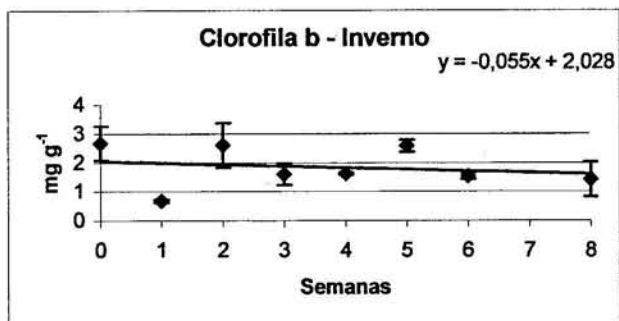
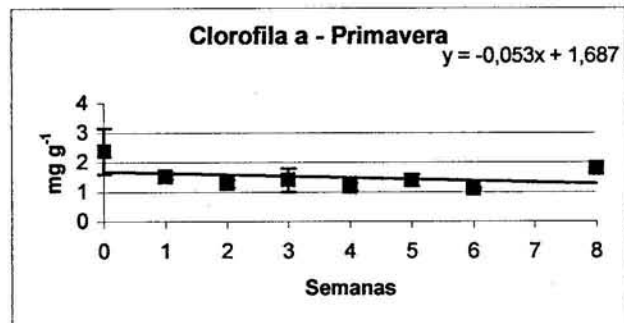
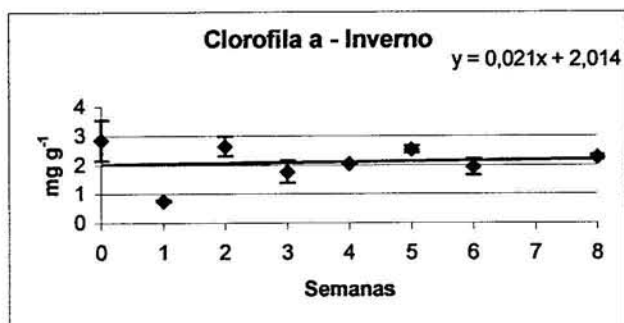


Figura 3.11. Teores semanais de clorofila a e b e carotenos totais nas exposições do Porto (Inverno e Primavera), em líquene destacado.

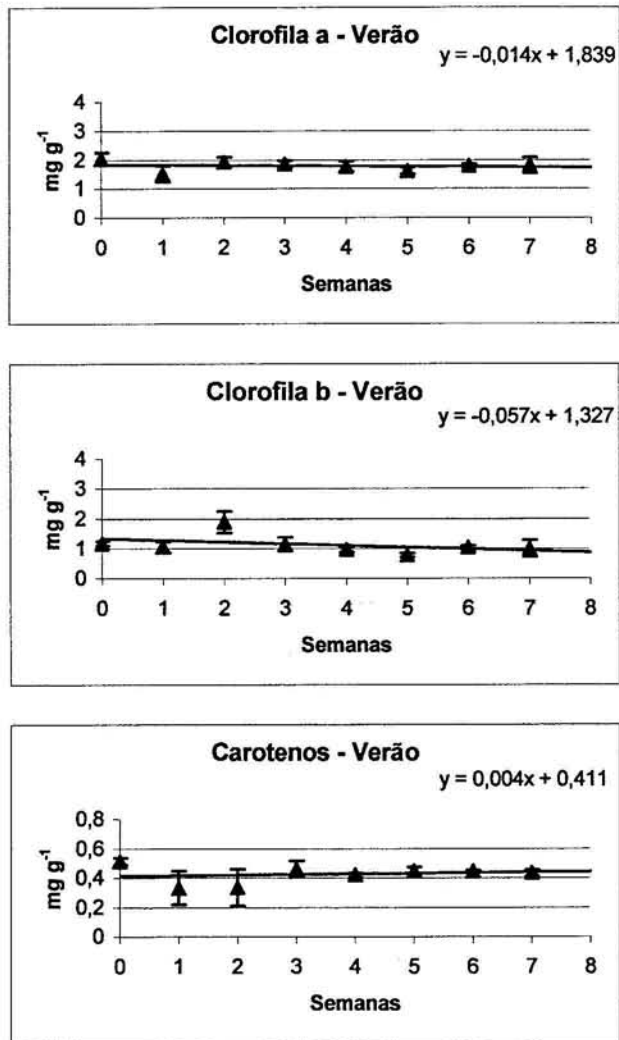


Figura 3.12. Teores semanais de clorofila a e b e carotenos totais nas exposições do Porto (Verão), em líquene destacado.

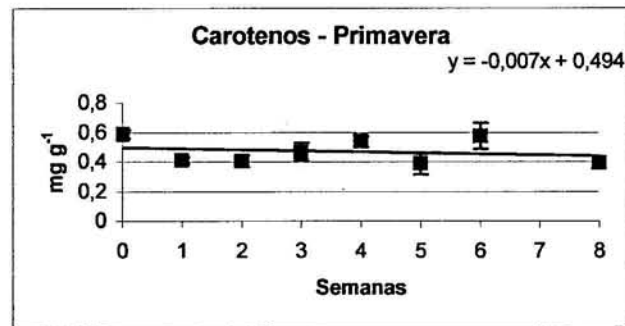
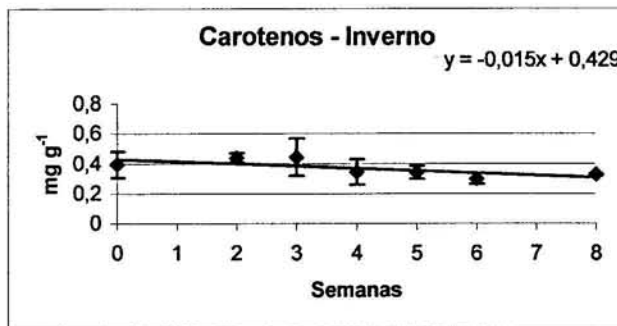
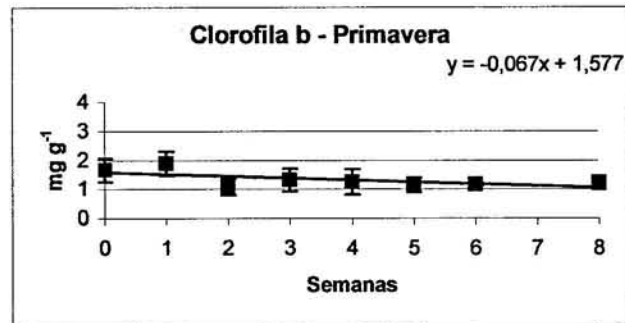
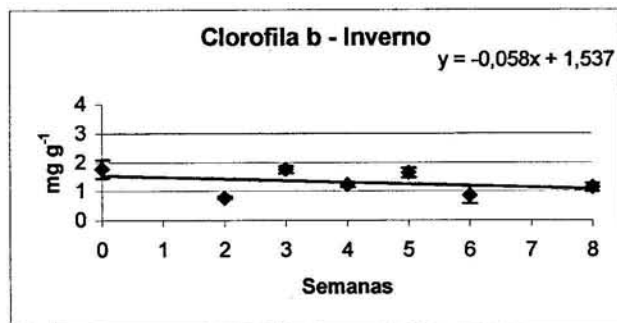
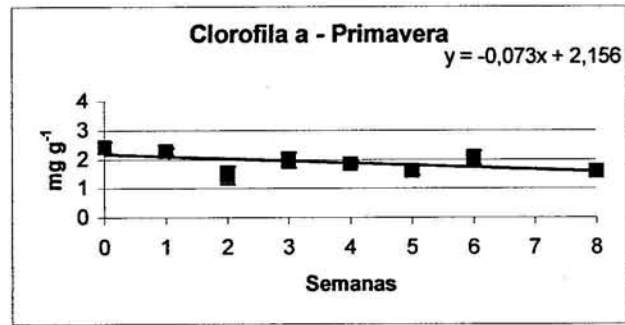
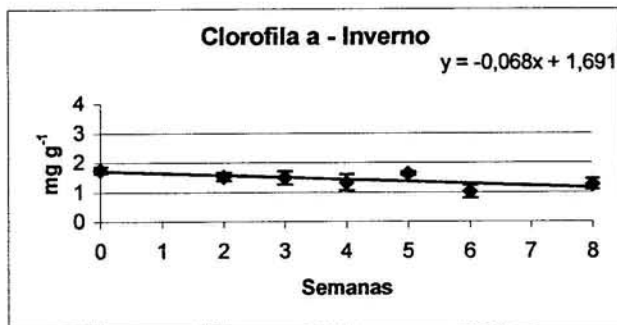


Figura 3.13. Teores semanais de clorofila *a* e *b* e carotenos totais nas exposições do Porto (Inverno e Primavera), em líquene no substrato.

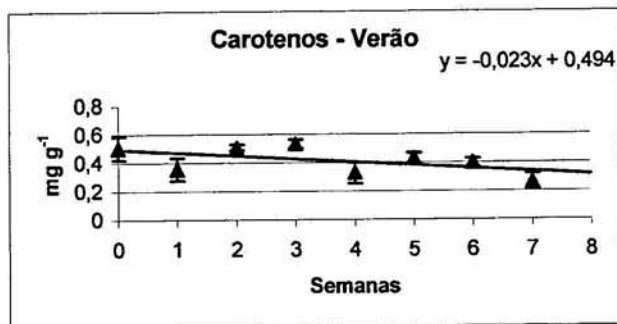
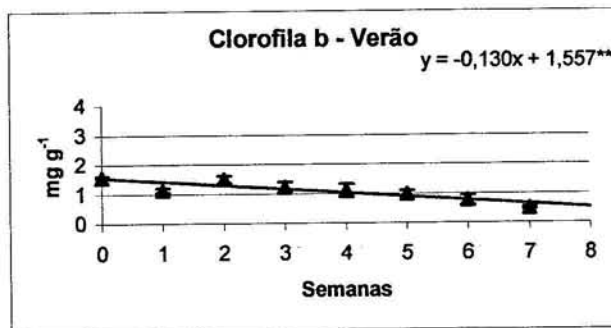
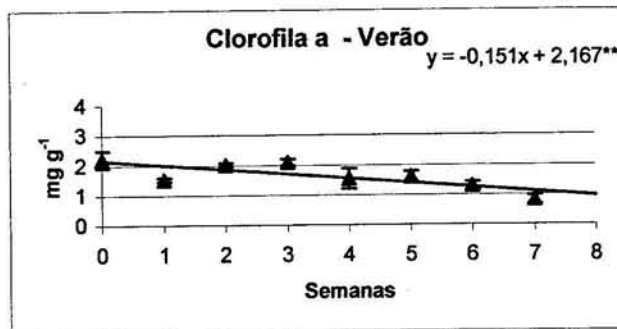


Figura 3.14. Teores semanais de clorofila a e b e carotenos totais nas exposições do Porto (Verão), em líquene no substrato.

**significativo a P = 0.05

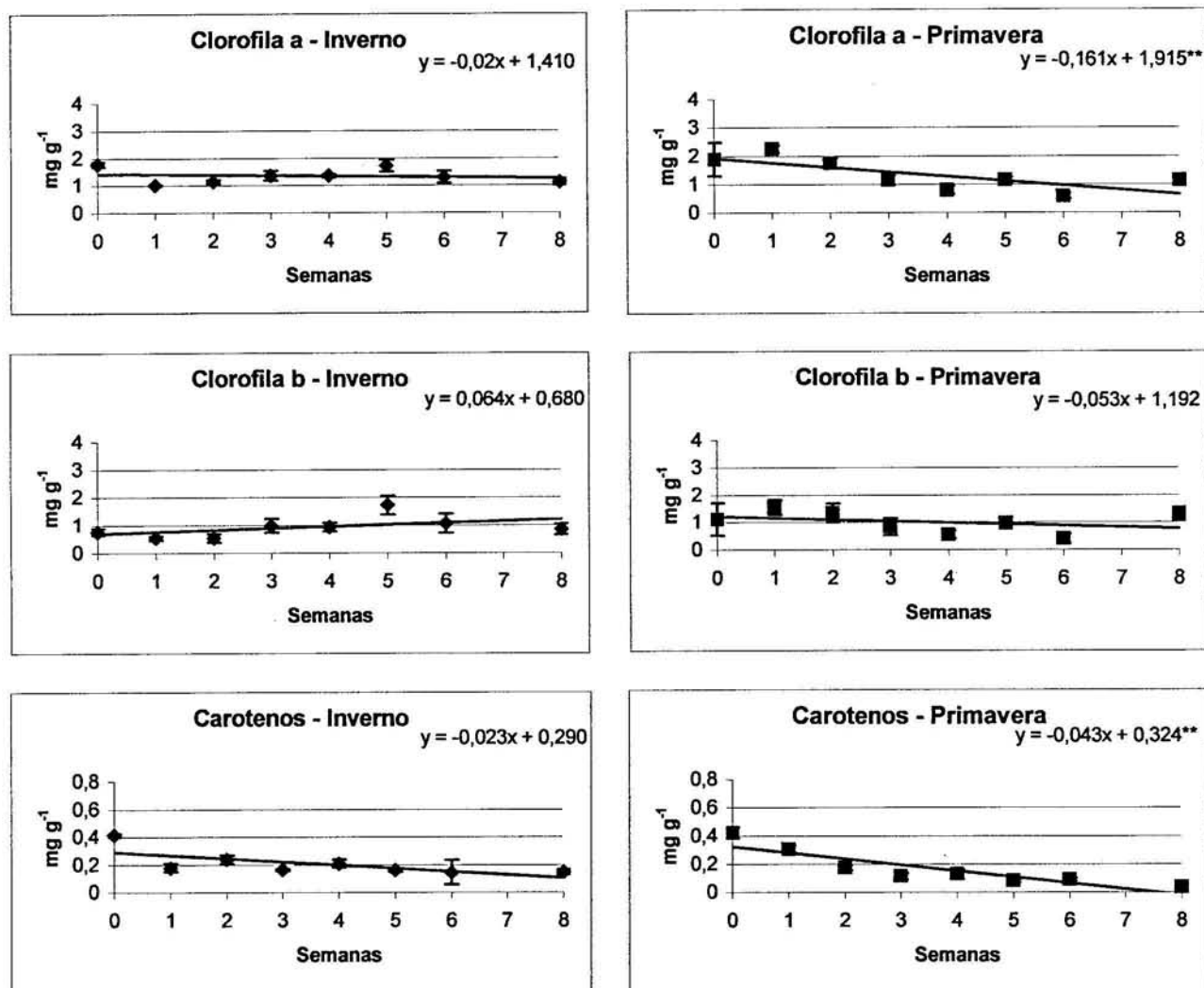


Figura 3.15. Teores semanais de clorofila a e b e carotenos totais nas exposições do Porto (Inverno e Primavera), em líquene moído.

**significativo a P = 0.05

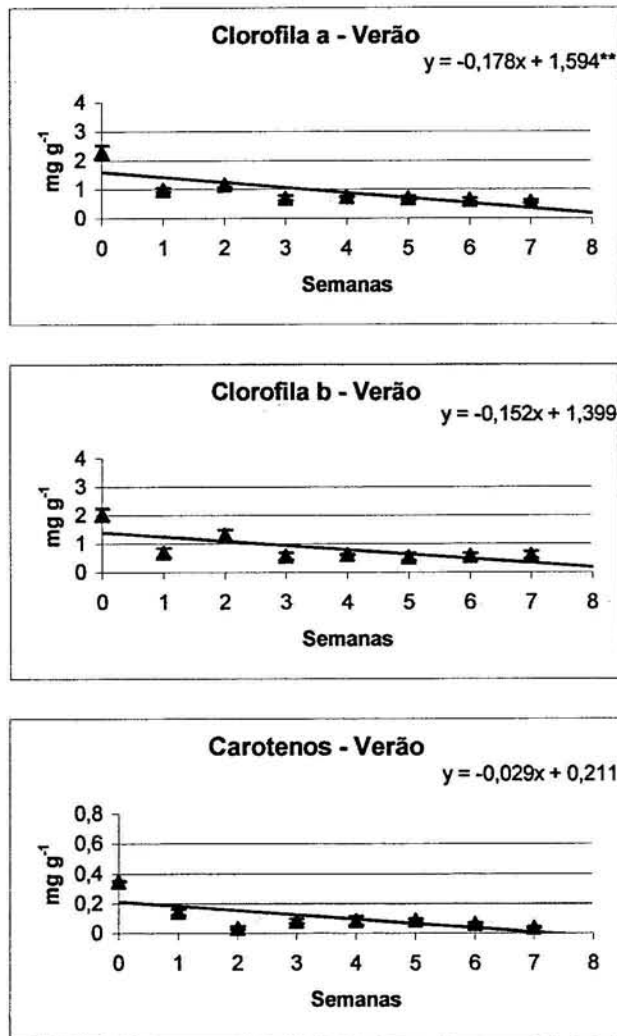


Figura 3.16. Teores semanais de clorofila *a* e *b* e carotenos totais nas exposições do Porto (Verão), em líquene moído.

**significativo a P = 0.05

Calculou-se a correlação linear simples (*r* de Pearson) para os teores de pigmentos fotossintéticos obtidos nas três formas de líquene expostas, em cada estação do ano. Os resultados apresentam-se nas tabelas 3.9 a 3.11.

Tabela 3.9. Coeficientes de correlação linear simples (r) entre os teores de pigmentos fotossintéticos nas três formas de líquene expostas, no Inverno.

	L _m -C _a	L _m -C _b	L _m -C _t	L _d -C _a	L _d -C _b	L _d -C _t	L _s -C _a	L _s -C _b	L _s -C _t
L _m -C _a	1								
L _m -C _b	0.610	1							
L _m -C _t	0.536	-0.325	1						
L _d -C _a	0.625	0.282	0.503	1					
L _d -C _b	0.709**	0.318	0.564	0.913***	1				
L _d -C _t	0.451	0.235	0.304	0.737*	0.424	1			
L _s -C _a	0.660	0.050	0.670	0.691*	0.811**	-0.057	1		
L _s -C _b	0.775**	0.411	0.341	0.105	0.242	0.108	0.666	1	
L _s -C _t	0.004	-0.439	0.375	0.170	0.397	-0.511	0.617	0.268	1

*significativo a $P = 0.1$; **significativo a $P = 0.05$; ***significativo a $P = 0.01$; L_m – Líquene moído, L_d – Líquene destacado, L_s – Líquene no substrato, C_a – clorofila *a*, C_b – Clorofila *b* e C_t – carotenos totais.

Tabela 3.10. Coeficientes de correlação linear simples (r) entre os teores de pigmentos fotossintéticos nas três formas de líquene expostas, na Primavera.

	L _m -C _a	L _m -C _b	L _m -C _t	L _d -C _a	L _d -C _b	L _d -C _t	L _s -C _a	L _s -C _b	L _s -C _t
L _m -C _a	1								
L _m -C _b	0.865***	1							
L _m -C _t	0.771**	0.394	1						
L _d -C _a	0.515	0.453	0.632*	1					
L _d -C _b	0.431	0.551	0.377	0.917***	1				
L _d -C _t	-0.149	-0.351	0.376	0.612	0.380	1			
L _s -C _a	0.343	-0.054	0.746**	0.442	0.205	0.406	1		
L _s -C _b	0.711**	0.452	0.787**	0.515	0.361	0.097	0.824**	1	
L _s -C _t	-0.293	-0.656*	0.366	0.160	-0.052	0.686*	0.631*	0.144	1

*significativo a $P = 0.1$; **significativo a $P = 0.05$; ***significativo a $P = 0.01$; L_m – Líquene moído, L_d – Líquene destacado, L_s – Líquene no substrato, C_a – clorofila *a*, C_b – Clorofila *b* e C_t – carotenos totais.

Tabela 3.11. Coeficientes de correlação linear simples (r) entre os teores de pigmentos fotossintéticos nas três formas de líquene expostas, no Verão.

	L _m -C _a	L _m -C _b	L _m -C _t	L _d -C _a	L _d -C _b	L _d -C _t	L _s -C _a	L _s -C _b	L _s -C _t
L _m -C _a	1								
L _m -C _b	0.967***	1							
L _m -C _t	0.901***	0.771**	1						
L _d -C _a	0.567	0.696*	0.336	1					
L _d -C _b	0.316	0.495	-0.099	0.525	1				
L _d -C _t	0.295	0.232	0.486	0.465	-0.469	1			
L _s -C _a	0.637*	0.614	0.511	0.460	0.464	0.134	1		
L _s -C _b	0.740**	0.730**	0.560	0.431	0.570	-0.055	0.944***	1	
L _s -C _t	0.478	0.497	0.324	0.486	0.497	0.193	0.911***	0.773**	1

*significativo a $P = 0.1$; **significativo a $P = 0.05$; ***significativo a $P = 0.01$; L_m – Líquene moído, L_d – Líquene destacado, L_s – Líquene no substrato, C_a – clorofila *a*, C_b – Clorofila *b* e C_t – carotenos totais.

Os resultados das medições semanais de potássio, para líquene destacado, líquene no substrato e líquene moído, encontram-se nas figuras 3.17 a 3.19.

Um teste t-student permite afirmar que em nenhuma das exposições e para nenhum dos líquenes, o declive foi estatisticamente ($P = 0.05$) diferente de zero.

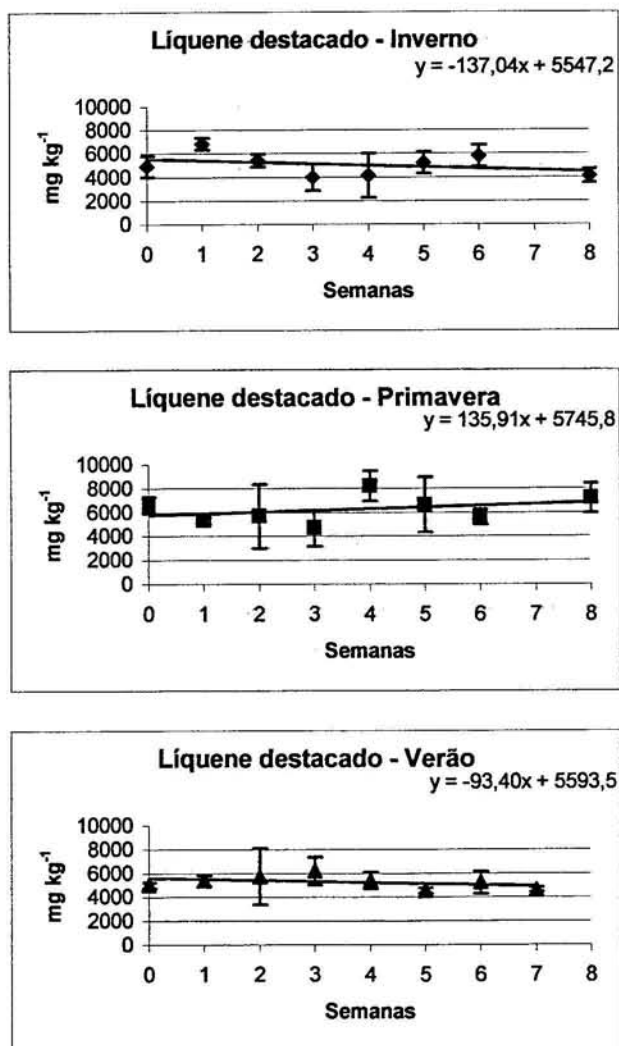


Figura 3.17. Teores semanais de potássio nas exposições do Porto, em líquene destacado.

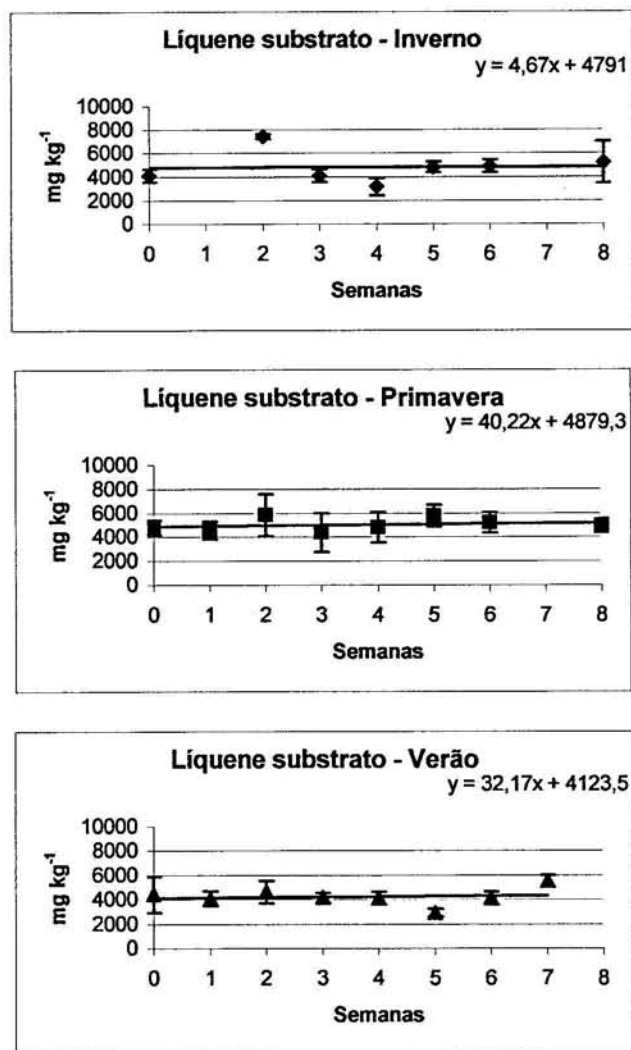


Figura 3.18. Teores semanais de potássio nas exposições do Porto, em líquene no substrato.

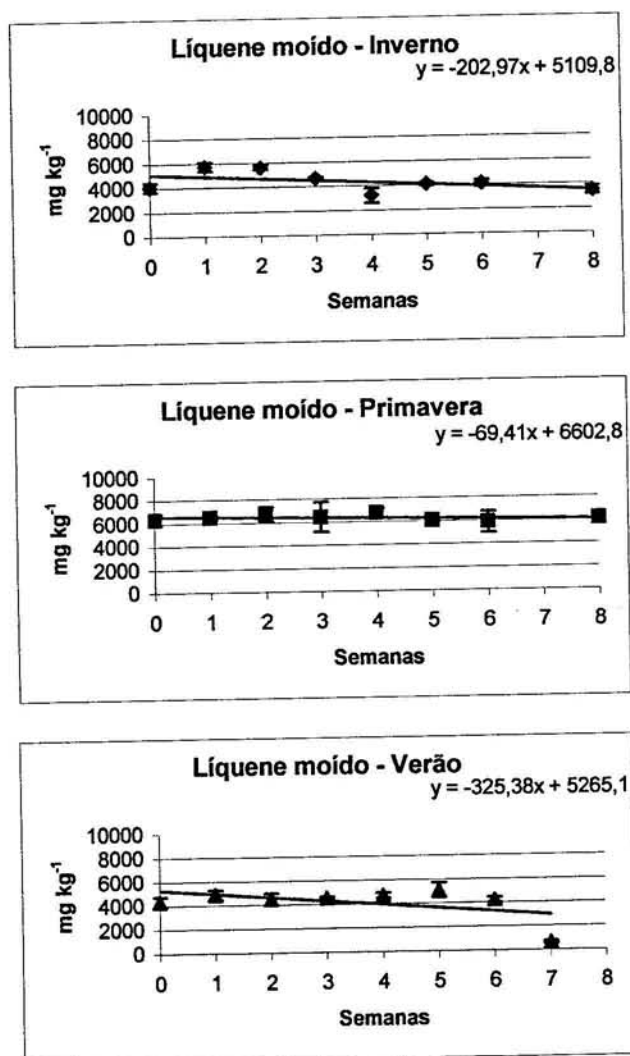


Figura 3.19. Teores semanais de potássio nas exposições do Porto, em líquene moído.

O teor em potássio de líquene moído e no substrato foi correlativo para as três exposições efectuadas, como se pode ver na tabela 3.12.

Tabela 3.12. Coeficientes de correlação linear simples (r) entre os teores de potássio nas três formas de líquene expostas.

	Líquene destacado	Líquene no substrato	Líquene moído
Líquene destacado	1		
Líquene no substrato	-0.787	1	
Líquene moído	0.759	-0.999**	1

**significativo a P = 0.05

4. Discussão



4.1. Avaliação do desempenho dos monitores como acumuladores de elementos atmosféricos

Neste estudo, pretendeu-se comparar o desempenho de biomonitores, usados tradicionalmente em estudos atmosféricos (líquene no substrato e casca inteira), com o desempenho de biomonitores moídos (líquene e casca), destacados do substrato (líquene) e monitores orgânicos sintéticos (acetato de celulose e resina Chelex 100).

Da análise dos resultados constata-se que foi no Inverno que ocorreram as maiores acumulações. No entanto, nesta estação, apenas se expuseram amostradores na cidade do Porto, o que não permite extrapolações para outros locais do país.

Mesmo assim, o teor em humidade do ar e a precipitação, parecem ser dois factores preponderantes para a acumulação de metais, a partir da atmosfera, por parte dos biomonitores. Esta relação foi já referida por diversos autores (Freitas *et al.*, 1999; Branquinho, 2001).

Apesar disso, a chuva tem também um papel importante na lavagem dos biomonitores e, sob a forma de aguaceiros, poderá contribuir mais para retirar metais insolúveis depositados à superfície, do que para aumentar o conteúdo dos biomonitores em elementos atmosféricos.

Nas exposições efectuadas em Porto, Viana do Castelo e Sines, nota-se uma discrepância entre as cidades do norte e a do sul, o que seria de esperar, tendo em conta as condições climáticas do nosso país. Assim, em Porto e Viana do Castelo, foi no Verão que a maioria dos monitores expostos acumulou teores dos quatro metais em estudo, enquanto que em Sines, a situação de maior variedade de monitores a acumular, se registou na Primavera.

No que toca aos biomonitores, expostos de forma tradicional, pode-se dizer que o seu desempenho, como acumuladores de metais de origem antropogénica, foi comparável a outros estudos publicados. Ambos se revelaram acumuladores de níquel, chumbo e cobre, embora no caso deste último, de forma mais irregular.

Em relação ao estrôncio, pode-se dizer que foram os biomonitores tradicionais que registaram as maiores acumulações. Em Viana do Castelo, no Verão, o líquene no substrato revelou um teor muito mais elevado, de estrôncio, do que qualquer outra forma de líquene, em qualquer outra exposição. No caso da casca inteira, ocorreu perda do teor em estrôncio, nas exposições de Verão, realizadas em Porto e Viana do Castelo, mas em Sines (quer na Primavera, quer no

Verão) os teores de estrôncio acumulados foram duas e três vezes maiores, respectivamente, do que o teor medido na casca não exposta.

O facto de a acumulação de estrôncio ser mais irregular, pode explicar-se por este ser um metal da classe A, que se liga aos biomonitores mais fracamente, do que o cobre, níquel ou chumbo. Grandes acumulações de estrôncio são compatíveis com grandes quantidades deste elemento na atmosfera, sendo que nesse caso, a elevada concentração do elemento obvia o facto de as ligações iónicas serem fracas. O estrôncio é descrito na literatura como sendo um metal tipicamente marinho. O facto de ter sido em Sines, que se registaram as maiores acumulações, justifica-se por ser o local de exposição mais próximo do mar.

Verificou-se que todos os biomonitores expostos são susceptíveis de registar perdas do teor em metal, se bem que ocorreram perdas de diferentes metais por parte de diferentes biomonitores. Assim, o líquene (no substrato, destacado e moído) registou perdas de teor para chumbo e níquel. Já a casca (inteira e moída) só registou diminuições do teor, em relação à casca não exposta, para cobre e estrôncio.

A ocorrência de lixiviação e a grande variabilidade, intrínseca ao material biológico, foram os factores que mais contribuíram para que se verificassem perdas de teores de metais, nos biomonitores expostos, em relação aos controlos.

Estas oscilações de teores são referidas na literatura. Calliari *et al.* (1995), realizaram um estudo no Norte de Itália com o líquene *Pseudevernia furfuracea*, em que transplantes de líquenes foram expostos em Março e retirados para análise, a cada dois meses, até Dezembro. Para o caso do cobre, a concentração obtida em Junho, numa área urbana, foi de 37 ppm, enquanto que em Dezembro, se ficou pelos 28 ppm. Situação idêntica verificou-se para o chumbo, que numa zona urbana, revelou um teor de 103 ppm em Novembro e de 76 ppm em Dezembro.

Garty *et al.* (1996), realizaram transplantes dos líquenes *Hypogymnia physodes* e *Usnea hirta* para a vizinhança de ruas com pouco tráfego e para a vizinhança de uma auto-estrada, na cidade de Oulu (Norte da Finlândia). As concentrações de chumbo e cobre nos transplantes junto a ruas com baixo volume de tráfego, foram maiores do que as registadas pelos transplantes junto da auto-estrada. Os autores propuseram que, uma maior taxa de abrasão do motor, derivada da baixa velocidade, as paragens nos semáforos e as condições de ventilação menos favoráveis, por as ruas estarem rodeadas por edifícios, foram os três principais factores que contribuíram para os resultados obtidos. Os valores obtidos para chumbo, cobre e níquel,

em *H. physodes*, no início do estudo, eram de 18.8, 10.4 e 10.9 mg kg⁻¹, respectivamente. A análise dos transplantes, colocados durante 45 dias junto à auto-estrada, revelou um teor em chumbo, cobre e níquel de 16.0, 10.8 e 7.3 mg kg⁻¹, respectivamente.

A irregularidade dos resultados obtidos neste estudo, pode explicar-se pelo reduzido número de réplicas analisado, em cada exposição. A variabilidade intrínseca ao material biológico ficou bem patente pelo número de análises em que o desvio padrão relativo foi superior a 100%, denotando a dificuldade de interpretação dos resultados com um baixo número de réplicas.

Os estudos de biomonitorização são, normalmente, interpretados à luz de análises de variância ou análises factoriais (métodos estatísticos que exigem elevado número de réplicas), para obviar a grande variação, decorrente do facto de se trabalhar com organismos vivos. Neste estudo, deu-se prioridade à comparação do desempenho de biomonitores clássicos (líquenes e casca expostos inteiros), com o desempenho obtido por biomonitores moídos, ou, no caso do líquene, destacado do substrato, e com monitores orgânicos sintéticos, tentando cobrir variadas condições atmosféricas, que se sabe terem muita influência nos resultados obtidos com biomonitores. Por esta razão, o número de réplicas expostas foi reduzido a três, preterindo-se a quantidade de informação, em relação à diversidade de dados sobre vários sistemas de exposição.

Por outro lado, todos os biomonitores não clássicos testados, também se revelaram capazes de acumular metais a partir da atmosfera.

A casca moída revelou-se acumuladora de chumbo e níquel, podendo essas acumulações ser comparadas às ocorridas para a casca inteira.

O líquene moído revelou-se um biomonitor extremamente irregular, não se podendo concluir, dos dados deste estudo, que acumule de forma sistemática qualquer um dos quatro metais. A ocorrência de um pico de níquel, na exposição de Porto, no Inverno, não comparável a qualquer outro valor registado nesta experiência, poderá ter-se devido a uma contaminação pontual.

O líquene destacado acumulou níveis de cobre, chumbo, níquel e estrôncio de forma comparável aos acumulados pelo líquene no substrato, sendo que, para o caso do chumbo e níquel, se pode afirmar que as acumulações registadas foram, regra geral, mais elevadas.

A análise comparativa, dos biomonitores utilizados, revela que, entre formas moídas e inteiras do mesmo biomonitor, se obtêm repostas diferentes, nas mesmas situações de exposição. Pode-se concluir que, para estes elementos, a acumulação deverá ser principalmente comandada pelas

características intrínsecas de cada biomonitor, embora a variabilidade inerente a condições de macro e micro-climas – como a acidez, temperatura, humidade, luminosidade, altitude – possam originar um comportamento variável por parte dos biomonitores.

Constatou-se que, os teores de níquel, obtidos no líquene inteiro não exposto, diferiam significativamente ($P = 0.05$) dos teores obtidos em líquene moído.

A variação do teor deste elemento, em amostras recolhidas no campo, é bastante grande, de tal forma que não existe um valor recomendado, nem mesmo informativo, no material de referência certificado IAEA 336 (Stone *et al.*, 1995). Por este facto, considerou-se a variação intrínseca ao material biológico como a causa desta discrepância.

No que diz respeito aos monitores orgânicos sintéticos, é possível afirmar que ocorreu acumulação de níquel e cobre, por parte do acetato de celulose e da resina Chelex 100, sem ser possível afirmar que um local ou uma estação do ano fossem mais favoráveis do que as outras. Há semelhança do que ocorreu para os biomonitores, no caso da resina Chelex 100, ocorreu diminuição do teor para chumbo e estrôncio.

Para a resina Chelex 100, os desvios padrão relativos das exposições, foram comparáveis aos que, globalmente, se registaram para os biomonitores, não permitindo concluir que, pelo facto de se tratar de um material sintético, a variação fosse menor do que a registada por materiais biológicos.

Já para o acetato de celulose, os desvios padrão relativos foram, regra geral, bastante elevados. Este facto não se enquadra naquilo que era o comportamento esperado deste material. Definiu-se, no início do estudo, que uma variação até 25% seria considerada aceitável para monitores biológicos, devido à sua variabilidade intrínseca, e, se houve casos em que esse limite foi excedido, de uma forma geral, os biomonitores estudados mantiveram-se dentro dessa gama de variação. Esperar-se-ia que um material sintético, como o acetato de celulose, apresentasse uma variabilidade mais reduzida. Um facto que não ajudou a perceber esta variação, foi o não se ter conseguido analisar o acetato de celulose não exposto, para nenhum dos metais estudados. Assim sendo, ficou-se sem termo de comparação para valores de variação usuais.

Pode-se dizer que os teores de cobre e níquel acumulados pelo acetato de celulose e Chelex 100, foram, sistematicamente, inferiores aos acumulados pelos biomonitores.

Para os elementos acumulados por ambos os monitores, os teores obtidos com acetato de celulose foram, de forma geral, mais elevados, dos que os obtidos com resina Chelex 100.

Poder-se-ia pensar que, a afinidade da Chelex 100 para o Cu(II), em sistemas aquosos, poderia significar um maior poder de captação de cobre a partir da atmosfera. Contudo, tal não aconteceu, o que poderá dever-se à falta de hidratação da resina, uma vez que ela opera sempre em presença de uma fase líquida, particularmente a água.

Os dois monitores estudados revelaram-se pouco eficientes na acumulação de chumbo e estrôncio atmosféricos. Esse facto, deve-se, provavelmente, às características do próprio monitor e ao tipo de ligações químicas que são capazes de estabelecer, sem estar em presença de uma fase líquida.

Num balanço geral, às capacidades de cada monitor para acumular os quatro metais em estudo, calcularam-se os coeficientes de correlação linear simples, no sentido de estabelecer relações entre as respostas à exposição atmosférica, dos vários monitores expostos.

Para o caso do cobre verificaram-se correlações entre o acetato de celulose e, por um lado, o líquene moído, e por outro, a resina Chelex 100, sendo que no primeiro caso a correlação foi negativa e no segundo positiva. Apesar disso, considerou-se que o líquene no substrato foi o monitor para o qual se registaram maiores acumulações de cobre. Mas do ponto de vista de acumulações consistentes, o acetato de celulose a resina Chelex 100 revelaram-se os monitores mais adequados, como se pode constatar das correlações obtidas.

Para acumular níquel, qualquer um dos monitores testados se revelou aceitável, com excepção do líquene moído. As acumulações foram sistemáticas, em todas as exposições, para o líquene destacado, para casca inteira e moída e para o acetato de celulose. Pode-se também dizer que o desempenho da resina foi bom uma vez que só não acumulou em Porto (Inverno e Verão). Contrariamente ao que se verificou para o cobre, diversos monitores apresentaram teores correlativos de níquel.

Assim, as três formas de líquene podem ser correlacionadas entre si, mas essa correlação só é positiva para o caso do líquene destacado e líquene moído. A comparação de qualquer uma destas formas, com líquene no substrato, origina correlações negativas. Para além disso, a correlação entre o líquene no substrato e o outro biomonitor com o qual se encontra em interdependência (casca moída), também foi negativa.

Sem dúvida que, o monitor que melhor se correlacionou com os restantes, foi a casca inteira, apresentando correlações positivas com líquene destacado, casca moída e com os dois monitores orgânicos sintéticos, podendo-se concluir que, dos monitores que acumularam níquel neste estudo, a casca inteira foi o mais consistente.

Para o chumbo e estrôncio não se verificaram correlações estatisticamente significativas.

Em relação ao chumbo, a casca inteira foi o único monitor, que acumulou este elemento, em todas as exposições. De resto, verificou-se uma capacidade acumulativa por parte dos biomonitores, com excepção do líquene moído, mas sem que isso se reflectisse de forma sistemática.

No que toca ao estrôncio, a casca inteira apresentou as maiores acumulações registadas, mas também perdeu teores significativos deste metal, e por isso o seu comportamento dificilmente é interpretável. Assim, as três formas de líquene, apesar de não apresentarem acumulações consistentes, podem ser considerados os melhores acumuladores de estrôncio, neste estudo.

4.2. Avaliação do controlo de vitalidade do líquene

Os valores de concentração, de pigmentos fotossintéticos determinados neste estudo, são comparáveis aos obtidos por Calatayud (1994), usando o líquene *Ramalina fraxinea* e com os obtidos por Pfeifhofer (2002), para o líquene *Pseudevernia furfuracea*.

Da análise dos espectros de absorção obtidos, verifica-se que os picos de absorvância, característicos do início da exposição, se mantêm, sensivelmente, nos mesmos valores, passados dois meses.

As correlações obtidas neste estudo indicam uma interdependência entre os valores de pigmentos fotossintéticos, nas três formas de líquene expostas.

No Inverno verificou-se uma correlação positiva, entre os valores de clorofila *a* e clorofila *b* e carotenos totais no líquene destacado. Tanto o conteúdo de clorofila *a* como o de clorofila *b*, do líquene destacado, estavam relacionados como os conteúdos em clorofila *a* e *b*, do líquene no substrato, respectivamente. O valor de clorofila *a*, para o líquene destacado, também era interdependente com o de clorofila *a* do líquene moído, podendo-se concluir que as maiores diferenças nos teores de pigmentos fotossintéticos, na exposição de Inverno, se registaram entre líquene destacado e moído, por um lado, e líquene no substrato, por outro.

Já na Primavera, verificaram-se correlações positivas entre teores em clorofila *a* e *b*, para as três formas de líquene, para além de correlações dos teores de clorofila e carotenos, entre diferentes formas de líquene.

Registou-se, nesta exposição, a única correlação, estatisticamente significativa, negativa, entre o teor de clorofila *b* no líquene moído e o teor de carotenos totais no líquene no substrato.

Apesar de os declives das rectas de clorofila *a* e carotenos totais, do líquene moído, indicarem uma diminuição do teor destes pigmentos, ao longo da exposição, as correlações obtidas não o deixaram transparecer.

Na exposição de Verão, os teores dos três pigmentos fotossintéticos foram correlativos entre si, nos líquenes moído e no substrato. Para além disso, foram ainda correlativos entre clorofila *b* de líquene no substrato e clorofila *a* e *b* de líquene moído. Verifica-se que nenhuma relação de interdependência envolveu o líquene destacado, podendo-se afirmar que, o líquene no substrato e líquene moído, exibiram teores de fotopigmentos, mais concordantes entre si, do que entre estes e o líquene destacado.

Novamente, o facto de o declive da recta de concentrações de clorofilas *a* e *b*, no líquene no substrato, e clorofila *a*, no líquene moído, ter indicado um decréscimo do teor destes pigmentos, ao longo da exposição, não foi impeditivo para a existência de correlações positivas com outros pigmentos analisados.

Seria de esperar uma diminuição dos teores de clorofilas e carotenos totais, ao longo da exposição se,

- a acumulação de metais fosse de tal ordem, que interferisse com o normal metabolismo das células, devido ao seu carácter tóxico;
- o manuseamento laboratorial para obtenção de líquene moído ou destacado, levassem à danificação de organelos e membranas, essenciais para o normal metabolismo das células.

Este estudo parece indicar que, nem o teor de metais acumulado, nem a moagem e corte do líquene, inviabilizaram a realização de processos fundamentais para a manutenção da vitalidade, tais como a fotossíntese.

Os dados obtidos para o caso do potássio coadunam-se com os obtidos para os pigmentos fotossintéticos, pois demonstram que o teor de potássio não variou, em nenhuma forma de líquene, durante os dois meses de exposição, podendo-se inferir, desse facto, que o conteúdo celular e respectiva membrana não foram afectados.

Uma vez que ambos os parâmetros avaliam as condições metabólicas e fisiológicas das células, seria de esperar que as informações obtidas fossem complementares. Assim parece ser, de facto, com os dados obtidos neste estudo.

5. Conclusão



Os resultados obtidos neste estudo revelam que a capacidade de acumulação de metais a partir da atmosfera, por parte de líquenes e casca, expostos de forma tradicional, pode ser utilizada como uma indicação da contaminação de uma dada região, sendo as informações, obtidas com os dois tipos de biomonitores, complementares.

Seria importante que, em outros estudos, se determinasse qual o nível de concentração intracelular, a partir do qual, determinado metal, se torna tóxico. Apesar disso, as concentrações de metais particulados (insolúveis) e concentrações extracelulares (metais ligados à parede da célula) parecem ser mais dependentes das concentrações no ambiente, do que do teor total desse metal no líquene.

Os líquenes são capazes de integrar a sua exposição física, química e biológica, a metais atmosféricos. Esta integração pode ser considerada vantajosa, por ter em consideração a interacção entre diferentes tipos de poluição, sendo representativa das condições a que o ecossistema está exposto.

As três formas de líquene, mantiveram-se nas mesmas condições vitais, durante os períodos de exposição, logo, as discrepâncias observadas na acumulação de metais, devem depender das capacidades de ligação iónica que estes biomonitores apresentam, e não do seu estado de vitalidade.

Os resultados obtidos para o líquene destacado foram concordantes com os obtidos para o líquene no substrato, para o cobre, chumbo, níquel e estrôncio. Seria interessante poder explorar melhor as capacidades acumuladoras desta forma de expôr líquene, uma vez que, o facto de se poder reduzir a quantidade de organismos que são retirados do ecossistema para efectuar estudos de biomonitorização ambiental e as vantagens que se podem retirar do facto de se poder quantificar a área exposta com exactidão são, por si só, justificação para um estudo pormenorizado.

Comparando as exposições de líquene e casca, nota-se que o material na forma moída tem um comportamento menos eficiente, em termos acumulativos, para os quatro metais estudados.

Fica assim posta de parte, a hipótese avançada neste estudo, de que estas biomassas poderiam ser mais eficientes na captação de metais atmosféricos do que o organismo inteiro.

Apesar de se ter verificado uma menor acumulação de metais, por parte de acetato de celulose e resina Chelex 100, as respostas obtidas com o uso destes monitores, são em tudo semelhantes às que se obtêm usando biomonitores. No entanto, a grande variabilidade entre réplicas é um factor que necessita ser minimizado, se se pretender utilizá-los em estudos de monitorização.

A sua utilização em estudos de monitorização atmosférica (particularmente no caso do acetato de celulose) poderá ser pertinente, na avaliação da contaminação de zonas urbanas e industriais, servindo como indicadores da qualidade do ar, pelo facto de acumularem metais discriminadamente.



Bibliografia

- Aderhold D, Williams CJ e Edyvean RGJ. The removal of heavy-metal ions by seaweeds and their derivatives. *Bioresource Technol* 1996;58:1-7.
- Alfani A, Batroli G, Rutigliano FA, Maisto G e Virzo De Santo A. Trace metal biomonitoring in the soil and the leaves of *Quercus Ilex* in the urban area of Naples. *Biological Trace Element Research* 1996;51:117-131.
- Aptroot A e van Herk CM. 1998. *Lecanora barkmaniana*, a new nitrophilous sorediate corticolous lichen from The Netherlands. In: van Herk CM. Mapping of ammonia pollution with epiphytic lichens in the Netherlands. *Lichenologist* 1999;31(1):9-20.
- Bargagli R, Nimis PL, e Monaci F. Lichen biomonitoring of trace elements deposition in urban, industrial and reference areas of Italy. *J Trace Elements Med Biol* 1997;11:173-175.
- Beckett RP. Determination of the parameters of lichen water relations. In: Kranner I, Beckett R, e Varma A (eds). *Protocols in Lichenology: culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring*. Springer lab manual Berlin 2002;236-254p.
- Beckett RP e Brown DH. The control of cadmium uptake in the lichen genus *Peltigera*. *Journal of Experimental Botany* 1984;35:1071-1082.
- Bennett JP e Buchen MJ. Bioleff: three databases on air pollution effects on vegetation. *Environm Pollut* 1995;88:261-265.
- Berdowski JJM, Pulles MPJ e Visschedjik AJH. Incremental cost and remaining emissions in 2010 of heavy metals resulting from the implementation of the draft HM Protocol under UN/ECE convention on long range transboundary air pollution. 1997. In: Ilyin I, Ryaboshapko A, Afinogenova O, Berg T e Hjellbrekke A. Evaluation of transboundary transport of heavy metals in 1999. *Trend Analysis. EMEP Report 2/2001*. 2001;127p.

- Bermen E. Toxic metals and their analysis. Heyden and Son, Ltd. London 1980;243p.
- Böhm P, Wolterbeek HTh, Verburg T, Musilek L.. The use of tree bark for environmental pollution monitoring in the Czech Republic. *Environmental Pollution* 1998;102:243-250.
- Boniforti R, Ferraroli R, Frigieri P, Heltai D e Queirazza G. Intercomparison of five methods for the determination of trace metals in sea water. *Analytica Chimica Acta* 1984;162:33-46.
- Branquinho C. Lichens. In: Prasad MNV (ed). *Metals in the Environment. Analysis by Biodiversity*. Marcel Dekker, Inc. New York 2001;117-157p.
- Branquinho C, Catarino F, Brown DH, Pereira MJ e Soares A. Improving the use of lichens as biomonitors of atmospheric metal pollution. *The Sci of Tot Env* 1999;232:67-77.
- Branquinho C, Brown DH, Máguas C e Catarino F. Pb uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence in different lichen species. *Environ Exp Bot.* 1997a;37:95-105.
- Branquinho C, Brown DH, e Catarino F. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence. *Environ Exp Bot.* 1997b;38:165-179.
- Brimblecombe P. *Air composition and chemistry*. Cambridge University Press 1986;126p.
- Brodo IM. Transplant experiments with corticolous lichen using a new technique. 1968. In: Richardson DHS. *Pollution monitoring with lichens*. The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough 1992; 62p.
- Brodo IM. *The Lichens of Long Island, New York; A vegetational and floristic analysis*. 1961 .In: Richardson DHS. *Pollution monitoring with lichens*. The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough 1992; 62p.

- Brown DH e Beckett RP. The role of the cell wall in the intracellular uptake of cations by lichens. 1985. In: Brown DH (ed). Lichen physiology and cell biology . Plenum Press London 1985;247-258p.
- Calatayud A, Sanz MJ, Barreno E e Valle-Táscon S del. Ventajas de la utilización del dimetilsulfóxido en la determinación de clorofilas e feofitinas en líquenes. *Studia Botanica* 1994;13:123-128.
- Calliari I, Caniglia G, Nardi S, Tollardo AM e Callegaro R. EDXRS study of lichens as biomonitors and effect of washing procedure on element concentrations. *X-Ray spectrometry* 1995;24:143-146.
- Comissão Europeia. Opções para um futuro mais verde – A União Europeia e o Ambiente. Serviço de Publicações Oficiais das Comunidades Europeias. Luxemburgo 2002;26p.
- Comissão Europeia. Economic Evaluation of Air Quality Targets for Heavy Metals. Serviço de Publicações Oficiais das Comunidades Europeias. Luxemburgo 2001;235p.
- Comissão Europeia. O Ambiente na Europa: segunda avaliação. Serviço de Publicações Oficiais das Comunidades Europeias. Luxemburgo 1998;289p.
- Comissão Europeia - Working Group on Lead Atmospheric Pollution. Air Quality Daughter Directives: position paper on lead. Serviço de Publicações Oficiais das Comunidades Europeias. Luxemburgo 1997;105p.
- de Wit T. Epiphytic lichens and air pollution. *Bibliogr Lichenol* 1996;5.
- Decisão nº 2002/1600/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Abril de 2002 relativa à aprovação, em nome da Comunidade Europeia, do protocolo de Quioto da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre alterações climáticas e ao cumprimento dos respectivos compromissos. *Jornal Oficial* nº L 130 de 15/05/2002;1-3p.

Decisão nº 2002/358/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Julho de 2002, que estabelece o sexto programa comunitário de acção em matéria de Ambiente. Jornal Oficial nº L 242 de 10/09/2002;1-15p.

Decreto Lei 111/2002. Diário da República I. 2002.

Decreto Lei 276/99. Diário da República I. 1999.

Dillman KL. Use of lichen *Rhizoplaca melanophthalma* as a biomonitor in relation to phosphate refineries near Pocatello, Idaho. Environ Pollut 1996;92:91-96.

Directiva 1999/30/CE do Conselho de 22 de Abril de 1999 relativa a valores-limite para o dióxido de enxofre, dióxido de azoto, óxidos de azoto, partículas em suspensão e chumbo no ar ambiente. Jornal Oficial nº L 163 de 29/06/1999;41-60p.

Directiva nº 1996/62/CE do Conselho de 27 de Setembro de 1996 relativa à avaliação e gestão da qualidade do ar ambiente. Jornal Oficial nº L 296 de 21/11/1996;55-63p.

Duffus JH. "Heavy Metals" – A meaningless term. Chemistry International 2001;23:6

Favas PJC, Pratas JAMS e Conde LEN. Bioacumulação de metais pesados em plantas colonizadoras de escombrelas (Mina de Vale das Gatas – Vila Real – Norte de Portugal). In: Prego R, Duarte A, Panteleitchouk A e Santos TR (eds). Estudos sobre contaminação ambiental na Península Ibérica. Instituto Piaget 2002; 259-273p.

Figura P e McDuffie B. Determination of labilities of soluble trace metal species in aqueous environmental samples by anodic stripping voltammetry and Chelex column and batch methods. Anal Chem 1980;52:1433-1439.

Fogarty RV, Dostalek P, Patzak M, Votruba J, Tel-Or E e Tobin JM. Metal removal by immobilized and non-immobilized *Azolla filiculoides*. Biotech Techniques 1999;13:533-538.

- Freitas MC, Reis MA, Alves LC e Wolterbeek HTh. Distribution in Portugal of some pollutants in the lichen *Parmelia sulcata* . Environ Pollut 1999;106:229-235.
- Freitas MC e Nobre AS. Bioaccumulation of heavy metals using *Parmelia sulcata* and *Parmelia caperata* for air pollution studies. J Rad Nucl Chem 1997a;217:17-20.
- Freitas MC, Reis MA, Alves LC, Wolterbeek HTh, Verburg T e Gouveia MA. Biomonitoring of trace-element air pollution in Portugal: Qualitative survey. J Rad Nucl Chem 1997b;217:21-30.
- Garty J. Biomonitoring Heavy Metal Pollution with Lichens. In: Kranner I, Beckett R, e Varma A (eds). Protocols in Lichenology: culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring. Springer lab manual Berlin 2002;458-482p.
- Garty J, Kauppi M e Kauppi A. Accumulation of airborne elements from vehicles in transplanted lichens in urban sites. J Environ Qual 1996;25:265-272.
- Garty J, Karary Y e Harel J. The impact of air pollution on the integrity of cell membranes and chlorophyll in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl transplanted to industrial sites in Israel. Environ Contam Toxicol 1993;24:455-460.
- Garty J, Karary Y e Harel J. Effect of low pH, heavy metals and anions on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. Environ Exp Bot 1992;32:229-241.
- Garty J, Ronen R e M Galun. Correlation between chlorophyll degradation and the amount of some elements in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Jatta. Environ Exp Bot 1985;25:67-74.
- Garty J e Fuchs C. Heavy metals in the lichen *Ramalina duriaei* transplanted in biomonitoring stations. Water Air Soil Pollut 1982;17:175-183.
- Garty J, Galum M e Kessel M. Localization of heavy metals and other elements in the lichen thallus. New Phytologist 1979;82:159-168.

- Gomes CAR. Propriedades de equilíbrio químico e cinéticas de complexantes em sistemas aquosos. Dissertação para Doutoramento em Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto 1999;303p.
- Goyal R e Seaward RD. Metal uptake in terricolous lichens. I. Metal localisation within the thallus. *New Phytol* 1981;89:631-645.
- Gray JS e Bewers JM. Towards a scientific definition of the Precautionary Principle. 1996. In: Luoma SN, Clements WH, DeWitt T, Gerritsen J, Hatch A, Jepson P, Reynoldson T e Thom RM. Role of environmental variability in evaluating stressor effects. Baird DJ e Burton GA (eds). *Ecological Variability: Separating natural from anthropogenic causes of ecosystem impairment*. Setac Press 2001;141-176p.
- Grindon LH. The Manchester Flora. London 1859. In: Richardson DHS. *Pollution monitoring with lichens*. The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough 1992;62p.
- Hänninen O, Ruuskanen J e Oksanen J. A method for facilitating the use of algae growing on tree trunks as bioindicators of air quality. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1993;28:215-220.
- Hawksworth DL e Rose F. Qualitative scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature* 1970;227:145-148.
- Hofmann F, Bracke G, Giesemann A, Siemers U, Wosniok W. Conference "Tree rings and People" Poster 19. Davos, Switzerland 2001.
- Howard AG e Statham PJ. *Inorganic Trace Analysis. Philosophy and Practice*. John Wiley & Sons Ltd 1993;182p.
- Hu H. Human Health and Heavy Metals exposure. In: McCally (ed). *Life Support: The environment and human health*. MIT press 2002;13p.

- Huhn G, Schulz H, Staerk HJ, Toelle R e Scheuermann G. Evaluation of regional heavy metal deposition by multivariate analysis of element contents in pine tree barks. *Water, Air and Soil Pollution* 1995; 84:367-383.
- Ilyin I, Travnikov O, Aas W e Uggerug HTh. Heavy metals: transboundary pollution of the environment. EMEP Report 2/2003. 2003;42p.
- Ilyin I, Ryaboshapko A, Afinogenova O, Berg T e Hjellbrekke A. Evaluation of transboundary transport of heavy metals in 1999. Trend Analysis. EMEP Report 3/2001. 2001;127p.
- Instituto do Ambiente. Avaliação preliminar da Qualidade do Ar em Portugal no âmbito da Directiva 1999/30/CE – SO₂ NO₂ NO_x PM₁₀ e Pb. 2002.90p.
- Irgum K. N-substituted aminoalkylsulfonates as eluents in membrane-supressed anion chromatography. *Anal Chem* 1987;59:358-364.
- Jones D, Wilson MJ e Laundon JR. 1982. Observations on the location and form of lead in *Stereocaulon vesuvianum*. *Lichenologist* 1982;14:281-286.
- Kühling W e Peters HJ. Die Bewertung der luftqualität bei Umweltverträglichkeitsprüfungen. 1994. In: Comissão Europeia - Working Group on Lead Atmospheric Pollution. Air Quality Daughter Directives: position paper on lead. Serviço de Publicações Oficiais das Comunidades Europeias Luxemburgo 1997;105p.
- Kuik P e Wolterbeek HTh. Factor-analysis of trace-element data from tree-bark samples in the Neatherlands. *Envir. Monitor. Assesss* 1994;32:207-206.
- Lamathe J. Methode d'elution selective pour l'extraction des metaux lourds de l'eau de mer sur resine chelatante. *Analytica Chimica Acta* 1979;104:307-317.
- Leal MFC. Estudo da labilidade de complexos de cobre(II) em presença de polímeros quelantes. Relatório de Seminário Científico de Licenciatura em Química. Faculdade de Ciências do Porto 1993;115p.

- Lichtenthaler HK. Chlorophylls and Carotenoids pigments of photosynthetic biomenbranes. *Methods in Enzimology* 1987;148:350-382.
- Long GL e Winefordner JD. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem* 1983;55(7):712-724.
- Loppi S, Pirintosos AS e Dominicis V. Soil contribution to the elemental composition of epiphytic lichens (Tuscany, Central Italy). *Environ Monit Assess* 1999; 58:121-131.
- Luoma SN, Clements WH, DeWitt T, Gerritsen J, Hatch A, Jepson P, Reynoldson T e Thom RM. Role of environmental variability in evaluating stressor effects. In: Baird DJ e Burton GA (eds). *Ecological Variability: Separating natural from anthropogenic causes of ecosystem impairment*. Setac Press 2001;141-176p.
- Martin MH e Coughtrey PJ. *Biological monitoring of heavy metal pollution*. London Applied Science Publishers 1982;475p.
- McNaught AD e Wilkinson A (eds). *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 1997.
- Milestone Application Note. 1990.
- Moura MJM, Sousa SMR, Vasconcelos MTSD e Machado AASC. Lead and Other Heavy Metals in Atmospheric Aerosols of Oporto. *Chemosphere*, 1988;17:2093-2106.
- Nash III TH. *Lichen Biology*. Cambridge University Press. Cambridge 1996. 303p.
- Nieboer E e Richardson DHS. The replacement of the nondescript term 'heavy metal' by a biological and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution (Series B)* 1980;1:3-26.

- Nieboer E e Richardson DHS, Lavoie P e Padovan D. The role of metal-ion binding in modifying the toxic effects of sulphur dioxide on the lichen *Umbilicaria muhlenbergii*. I. Potassium efflux studies. *New Phytol* 1979;82:621-632.
- Nieboer E, Puckett KJ, Richardson DHS, Tomassini FD e Grace B. Ecological and physicochemical aspects of the accumulation of heavy metals and sulphur in lichens. *International Conference on Heavy Metals in the Environment, Toronto, Ontario* 1975;331-352p.
- Nriagu JO. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 1989; 338:27-49p.
- Nylander W. Les lichens du Jardin du Luxembourg. *Bulletin de la Société de Botanique de France*, 1866;13:364-372. In: Richardson DHS. *Pollution monitoring with lichens*. The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough 1992;62p.
- Pacheco AMG, Freitas MC, Barros LIC e Figueira R. Investigating tree bark as an air-pollution biomonitor by means of neutron activation analysis, *J Radioanal Nucl Chem* 2001; 249(2):327-331.
- Pacyna J, Pacyna E, Klimont Z, Johanson M, Gyarfás F, Cofala J, Amann M, Bertók I e Luckewill A. A module to calculate Primary particulate matter emissions and abatement measures in Europe. 1999. In: Ilyin I, Ryaboshapko A, Afinogenova O, Berg T e Hjellbrekke A. *Evaluation of transboundary transport of heavy metals in 1999. Trend Analysis. EMEP Report 2/2001*. 2001;127p.
- Pfeifhofer HW, Willfurth R, Zorn M e Kranner I. Analysis of chlorophylls, carotenoids and tocopherols in Lichens. In: Kranner I, Beckett R, e Varma A (eds). *Protocols in Lichenology: culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring*. Springer lab manual Berlin 2002;363-378p.
- Poikolainen J. Sulphur and heavy metal concentrations in Scots pine bark in northern Finland and the Kola Peninsula. *Water, Air and Soil Pollution* 1997;93:395-408.

Portaria 399/97. Diário da República I. 1997.

Portaria 1489/95. Diário da República I. 1995.

Portaria 125/89. Diário da República I. 1989.

Puckett KJ. Bryophytes and lichens as monitors of metal deposition. 1988. In: Nash, III, T.H. e Wirth, V. (eds). Lichens, Bryophytes and Air Quality. Bibliotheca Lichenologica Berlin 1998;233p.

Prussia CM e Killingbeck KT. Concentration of ten elements in two common foliose lichens: leachability, seasonality, and influence of rock and tree bark substrates. Bryologist 1991;94:135-142.

Reis MA, Alves LC, Freitas MC, van Os B e Wolterbeek HTh. Lichen *Parmelia sulcata* time response model to environmental elemental availability. The Sci of Tot Env. 1999;232:105-115.

Richardson DHS. Metal uptake in lichens. Symbiosis 1995;18:119-127.

Richardson DHS. Pollution monitoring with lichens. The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough 1992;62p.

Ronen R e Galun M. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. Environ Exp Bot 1984;24:239-245.

Saeki M, Kunii K, Seki T, Sugiyama K, Suzuki T e Shishido S. Metal burdens in urban lichens. Environmental Research 1977;13:256-266. In: Richardson DHS. Pollution monitoring with lichens. The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough 1992;62p.

Sawidis T, Marnasidis A, Zachariadis G e Stratis JA. A study of air-pollution with heavy-metals in Thessaloniki City (Greece) using trees as biological indicators. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 1995;28:118-124.

- Schulz H, Popp P, Huhm G, Stärk HJ e Schürmann G. Biomonitoring of airborne inorganic and organic pollutants by means of pine tree barks – I. Temporal and spatial variations. In: Smodis B (ed). Biomonitoring of atmospheric pollution (with emphasis on trace elements) – BioMAP (IAEA-TECDOC-1152). International Atomic Energy Agency, Vienna 2000;149-158p.
- Seaward MRD. Lichens as monitors of recent changes in air pollution. *Plants Today* 1989;2:64-69.
- Silberstein L, Siegel BZ, Siegel SM, Mukhtar A e Galun M. Comparative studies on *Xanthoria parietina*, a pollution-resistance lichen, and *Ramalina duriaei*, a sensitive species. I. Effects of air pollution on physiological processes. *Lichenologist* 1996;28:355-365. In: Branquinho C. Lichens. In: Prasad MNV (ed). *Metals in the Environment. Analysis by Biodiversity*. Marcel Dekker, Inc. New York 2001;117-157pp.
- Silva JJRF e Williams RJP. The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life. Clarendon Press Oxford 1993;561p.
- Skye E. Luftforeningars inverkan pa pusk-och bladlavfloran kring skifferoljeverket i Narakes Kvarntorp. *Svensk botanische Tidsskrift* 1958;52:133-190. In: Richardson DHS. *Pollution monitoring with lichens*. The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough 1992;62p.
- Skogley EO e Dobermann A. Synthetic Ion-Exchange Resins: Soil and Environmental Studies. *J Environ Qual* 1996;25:13-24.
- Sloof JE e Wolterbeek H Th. 1991. National Trace-element air pollution monitoring survey using epiphytic lichens. *Lichenologist* 1991;23(2):139-165.
- Starling AP e Ross IS. Uptake of manganese by *Penicillium notatum*. *Microbios* 1990;63:93-100.
- Stone SF, Freitas MC, Parr RM e Zeisler R. Elemental characterization of a Candidate Lichen Research Material – IAEA 336. *J Anal Chem* 1995;352:227-231.

- Stratis JA, Zachariadis G, Simeonov V, Mandjukov P e Sawidis T. Chemometrical classification of biomonitoring analytical data for heavy metals. Part I. Trees (leaves) as bioindicators. *Toxicological and Environmental Chemistry* 1995;54:29-37.
- Swietlicki E, Bartnicki J, Jalkanen L, Kemp K, Wählín P e Krejci R. Heavy Metals in the Atmosphere - Comparison of source-receptor relationships estimated by means of receptor and meteorological dispersion modelling. Lund University Report No. LUTFD2/(TFKF-3079)/1- 29/(1996).1996.
- Tavares HMCF. Caracterização de Atmosferas Abertas e Ocupacionais quanto ao teor em Metais Pesados e a sua Interacção com Sistemas Biológicos. Dissertação para Doutoramento em Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto 1998;231p.
- Tavares HMCF e Vasconcelos MTSD. Comparison of lead levels collected by *Sphagnum auriculatum* and by a low-volume aerosol sampler in the urban atmosphere of Oporto. *Toxicol Environ Chem* 1996;54:195-209.
- Thomann RV, Mahoney JD e Muller R. Steady-state model of biota-sediment accumulation factors for metals in two marine bivalves. 1995. In: Luoma SN, Clements WH, DeWitt T, Gerritsen J, Hatch A, Jepson P, Reynoldson T e Thom RM. Role of environmental variability in evaluating stressor effects. Baird DJ e Burton GA. (eds) *Ecological Variability: Separating natural from anthropogenic causes of ecosystem impairment*. Setac Press 2001;141-176p.
- Turner D e Borrer W. Specimen of a Lichenographia Britannica. Yarmouth 1839. In: Richardson DHS. Pollution monitoring with lichens. The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough 1992;62p.
- Valle-Tascón S del, Sanz MJ, Calatayud A e Barreno E. Coeficientes de extinción de clorofilas y feofitinas (*a* y *b*) en DMSO y ecuaciones para el cálculo de sus concentraciones. *Studia Botanica* 1994;13-115-121.
- van Herk CM. Mapping of ammonia pollution with epiphytic lichens in The Netherlands. *Lichenologist* 1999;31(1):9-20.

- van Herk CM e Aptroot A. Epifytische korstmossen komen weer terug. 1996. In: van Herk CM. Mapping of ammonia pollution with epiphytic lichens in The Netherlands. *Lichenologist* 1999;31(1):9-20.
- Vasconcelos MTDS e Tavares HMC. Atmospheric metal pollution (Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) in Oporto city derived from results for low-volume aerosol samplers and for the moss *Sphagnum auriculatum* bioindicator. *Science Total Environ* 1998;212:11-20.
- Wang WX, Fisher NS e Luoma SN. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. 1996. In: Luoma SN, Clements WH, DeWitt T, Gerritsen J, Hatch A, Jepson P, Reynoldson T e Thom RM. Role of environmental variability in evaluating stressor effects. Baird DJ e Burton GA. (eds) *Ecological Variability: Separating natural from anthropogenic causes of ecosystem impairment*. Setac Press 2001;141-176p.
- Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol* 1994;144:307-313.
- Wetmore CM. Lichen floristics and air quality. *Bibliotheca Lichenologica* 1988;30:55-65
- Whiteside PJ e Milner BA. *Pye Unicam Atomic Absorption Data Book*. Sixth Edition Pye Unicam Ltd. 1984.
- Wittig R. General aspects of biomonitoring heavy metals by plants. In: Markert B (ed). *Plants as Biomonitors. Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*. VCH, Weinheim 1993;3-27p.
- Wolterbeek HTh e Bode P. Strategies in sampling and sample handling in the context of large-scale plant biomonitoring surveys of trace element air pollution. *Science Total Environ* 1995; 176:33-43.