



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
Fundação Instituída nos termos da Lei 5.152 de 21/10/1966 – São Luís – Maranhão  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (Modalidade:  
bacharelado)**

**EMANUELLE COSTA RAMOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE LÍQUENS E SEU USO COMO BIOINDICADORES NA  
REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL.**

**SÃO LUÍS**  
**2025**

**EMANUELLE COSTA RAMOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE LIQUENS E SEU USO COMO BIOINDICADORES NA  
REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL**

Monografia apresentada ao curso de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Maranhão para obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol

Co-orientador(a): Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Iane Paula Rego Cunha Dias

**SÃO LUÍS  
2025**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Costa Ramos, Emanuelle.

IDENTIFICAÇÃO DE LÍQUENS E SEU USO COMO BIOINDICADORES  
NA REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL /  
Emanuelle Costa Ramos. - 2025.

53 p.

Coorientador(a) 1: Iane Paula Rego Cunha Dias.

Orientador(a): Leonardo Teixeira Dall'agnol.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2025.

1. Bioindicador. 2. Diversidade. 3. Fungos  
Liquenizados. 4. Metabólitos Secundários. 5.  
Microplásticos. I. Rego Cunha Dias, Iane Paula. II.  
Teixeira Dall'agnol, Leonardo. III. Título.

**EMANUELLE COSTA RAMOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE LIQUENS E SEU USO COMO BIOINDICADORES NA  
REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Aprovada em:** 25/02/2025

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall'Agnol - Orientador

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof. Dr. Iane Paula Rego Cunha Dias- Co-Orientadora

Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão - UEMASul

---

Prof. Dr. Juliano dos Santos - 1º Examinador

Instituto Federal do Maranhão - IFMA

---

Prof. Dr. Ulisses Magalhães Nascimento - 2º Examinador

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

“A vida é um caminho que se faz percorrendo, e  
não um destino que se alcança”

- Papa Francisco

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus! Pelo dom da vida; por todas orações ouvidas; por me manter em bons caminhos e me guiar em todos os momentos, dentro e fora das atividades acadêmicas; por me manter sempre firme, fortalecendo a fé, a paciência, dedicação, humildade e expressando constantemente seu amor por meio de pessoas e momentos especiais; por sua mãe, Maria, que intercede pela minha vida e ilumina meus pensamentos.

A minha família, minha fonte de incentivo e inspiração. Aos meus pais, Bernardo e Rosilene, que nunca hesitaram em buscar o melhor para nós; por sempre me mostrarem o melhor caminho e me ensinarem o que é essencial para a vida; por nunca terem medido esforços para me colocar em boas fontes de educação e pelo cuidado eterno. Vocês são meu maior exemplo de família, amigos e de fé. A minha irmã Adryelle e minha sobrinha Alice, por serem minhas melhores amigas, por me proporcionar todos os dias experimentar o amor, o companheirismo e a alegria. Amo vocês de todo o meu coração!

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta pela minha formação básica; aos professores e colegas que, por meio de seu trabalho, diariamente lutam por um Brasil com acesso à educação. Minha eterna gratidão! A minha prima Carliana, por ser amiga e desejar tanto quanto eu as minhas realizações. Aos amigos da família, em especial, o meu padrinho Luís e toda sua família, que sempre compartilham conosco o seu companheirismo, incentivo e, principalmente, pela amizade. Obrigada por sempre se fazerem presentes!

Ao meu orientador Leonardo Dall'Agnol, que me acolheu no início da graduação e desde então sempre foi um grande incentivador; por todo o conhecimento passado de forma tão generosa; por demonstrar sua confiança e apoio por meio de trabalhos de pesquisa direcionados a mim, serei sempre grata por ter sido acompanhada por um profissional tão dedicado e, além de tudo, amigo; A prof<sup>a</sup> Hivana Dall Agnol, por ser uma figura inspiradora de professora e exemplo de mulher na ciência. Meus mais sinceros agradecimentos. Vocês são exemplo e inspiração para mim.

A prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Iane Paula, por seu acompanhamento e apoio; sua carreira é admirável e inspiradora para mim. Sempre serei grata pelos ensinamentos e por ter tido a oportunidade de lhe conhecer.

Aos meus amigos da turma de 2020.1, em especial Vitória, Gabriel, Angelo, Jéssica e João Gabriel, por se fazerem presentes desde o primeiro dia na graduação e por

todos os momentos em que compartilhamos a felicidade, angústias, sonhos e o amor que sustenta nossa amizade. Admiro muito a trajetória de vocês e certamente já tenho orgulho dos profissionais que vocês serão.

Aos amigos que fiz ao longo da vida acadêmica: Jackson, Safira e Millene; por todas as nossas conversas sobre a vida e troca de conhecimento; por estarem comigo em momentos difíceis e de pura alegria; sem dúvidas ter vocês em todos os dias da graduação tornou tudo mais leve e significativo. Desejo o mais sincero sucesso a vocês.

Aos meus amigos de laboratório; A Anna Letícia e Isaías que sempre demonstraram seu apoio, incentivo e que contribuíram de forma significativa na minha formação. Vocês são inspiração para mim! Ao meu amigo Weneson; por dividir comigo todas as experiências, especialmente nos últimos meses, por ter sido sempre um grande apoio e por estar comigo nessa trajetória (e nas próximas); acredito muito em você e te desejo o sucesso tanto quanto almejo para mim. Aos meus amigos e companheiros de bancada e de “café’s”: Davi, Amália, Maria Clara, Nathalia, Yago, Vinicius, Rayssa e Amanda, meu imenso carinho e admiração. Agradeço também aos queridos Felipe e Vinícios, por todas as trocas de boas conversas e conselhos pelo laboratório. A todos os membros do grupo GB3, todo tempo que passamos juntos guardo no coração, seja desesperados por percalços da vida acadêmica, seja dividindo o lanche na cozinha.

A quem primeiro me acompanhou no grupo de pesquisa, Daniele, Igor e Thayanne, que foram pessoas que me acolheram e me guiaram de forma carinhosa. Meus sinceros agradecimentos. Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM), que foi o lugar onde me encontrei e que contribuiu para minha formação. A Gisele, colaboradora do laboratório, por todas as conversas e auxílio. A Santinha, por ser uma mãe em quase toda essa trajetória, me ensinando sobre técnicas e, principalmente, sobre a vida.

Ao Diretório Acadêmico gestão Bertha Lutz, por me permitir viver um outro lado da universidade, vivenciando boas discussões, compartilhando ideias e pelos amigos que fiz a partir desta vivência.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica. Que esta não seja apenas uma etapa concluída, mas o caminho para muitas outras experiências e incentivo para a formação de novos(as) biólogos(as) e profissionais!

## RESUMO

Os líquens representam a forma simbiótica de vida dos fungos com microrganismos fotossintetizantes, correspondendo a algas verdes e/ou cianobactérias. O estabelecimento da simbiose promove diversidade a nível morfológico, molecular, químico e ecológico, no entanto, somente cerca de 20% dessa diversidade é caracterizada. O objetivo deste trabalho é caracterizar a nível morfológico e químico os líquens de locais com diferentes níveis de conservação ambiental, indicando o seu potencial uso como bioindicadores. Foram coletados um total de 29 espécimes, com morfologia de talo variada entre gelatinoso, crostoso, filamentosos e foliosos. A partir do levantamento de características morfológicas que guiam a identificação taxonômica, foram reconhecidos 12 gêneros de fungos liquenizados distribuídos entre as famílias Lecanoraceae, Graphidaceae, Parmeliaceae, Teloschistaceae, Collemataceae, Caliciaceae, Candelariaceae, Tephromelataceae e Physciaceae. Foram realizados testes químicos para caracterização e identificação de metabólitos secundários. Por meio da cromatografia de camada delgada foi possível identificar compostos que são essenciais para a determinação de gêneros como xantonas, depsídeos, ácidos fenólicos, entre outros. O uso de metodologia voltada para análise de níveis de acumulação de microplásticos permitiu a detecção de fragmentos sintéticos presentes no talo liquênico de espécimes coletados nas áreas de diferentes níveis de impacto ambiental. O presente trabalho permitiu uma melhor compreensão da diversidade de fungos liquenizados encontrados no município de São Luís, bem como o uso destes organismos como ferramenta para indicar a qualidade ambiental local.

**Palavras-chave:** Bioindicador, Diversidade, Fungos liquenizados, Metabólitos secundários, Microplásticos.

## ABSTRACT

Lichens represent the symbiotic form of life of fungi with photosynthetic microorganisms, corresponding to green algae and/or cyanobacteria. The establishment of symbiosis promotes diversity at a morphological, molecular, chemical and ecological level, however, only around 20% of this diversity is characterized. The objective of this work is to characterize, at a morphological and chemical level, lichens with different environmental impacts, indicating their potential use as bioindicators. A total of 29 specimens were collected, with stem morphology varying between gelatinous, crusty and foliose. From the survey of morphological characteristics that guide taxonomic identification, 12 genera of lichenized fungi were recognized, distributed among the families Lecanoraceae, Graphidaceae, Parmeliaceae, Teloschistaceae, Collemataceae, Caliciaceae, Candelariaceae, Tephromelataceae and Physciaceae. Chemical tests were carried out to characterize and identify secondary metabolites. Using thin layer chromatography, it was possible to identify compounds that are essential for the determination of genera such as xanthones, depsides, phenolic acids, among others. The use of a methodology aimed at analyzing levels of microplastic accumulation allowed the detection of synthetic fragments present in the lichen stem of specimens collected in areas with different levels of environmental impact. The present work allowed a better understanding of the diversity of lichenized fungi found in the municipality of São Luís, as well as the use of these organisms as a tool to indicate local quality.

**Keywords:** Bioindicator, diversity, lichenized fungi, secondary metabolites, microplastics.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. 1. Simbiose liquênica.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Fungos liquenizados.....</b>	<b>16</b>
<b>2. 3. Microrganismos fotossintetizantes.....</b>	<b>17</b>
<b>2. 4. Caracterização Química dos líquens.....</b>	<b>19</b>
<b>2. 4. 1 Cromatografia de Camada Delgada.....</b>	<b>21</b>
<b>2. 5. Poluição ambiental e líquens como bioindicadores.....</b>	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Geral.....</b>	<b>23</b>
<b>3. 2. Específicos.....</b>	<b>23</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Caracterização da área de estudo e pontos de coleta.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Coletas e armazenamento.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 Caracterização morfológica e identificação.....</b>	<b>26</b>
<b>4.4. Caracterização química.....</b>	<b>26</b>
<b>4.4.1 Reações de coloração.....</b>	<b>26</b>
<b>4.4.2. Identificação de substâncias liquênicas.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4.3. Avaliação da deposição de microplástico .....</b>	<b>28</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>5. 1. Caracterização morfológica e identificação.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1.1. Estruturas reprodutivas.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2. Caracterização química.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.1 Teste de reação de coloração por contato (KC).....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.3 Análise da acumulação de microplásticos.....</b>	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A simbiose líquênica representa uma forma de vida fundamental de organismos fúngicos, onde estes estão distribuídos em um quinto das espécies conhecidas, sendo o grupo ascomycota corresponde a 98% de líquens descritos. (Blanco *et al.*, 2005). O sucesso de associação dos parceiros simbióticos permite sua ampla distribuição, caracterizada em cerca de 8% dos ecossistemas terrestres que variam entre condições extremas de regiões tropicais e polares até o seu estabelecimento em locais de com faixas de temperatura amenas (Santiago, 2016).

Em proposta descrita no Código Internacional de Nomenclatura Botânica, os fungos liquenizados (anteriormente denominados *Lichenes*) migraram para nova classificação a partir do ano de 1981 devido a descrição de características ecológicas e morfológicas restritas ao grupo, sendo estes distribuídos em 19% das espécies de fungos atualmente conhecidas. (Marcelli, 1997, Hawksworth *et al.*, 1995). Os fotobiontes pertencentes à associação correspondem aos microrganismos fotossintetizantes inseridos no corpo vegetativo do líquen (talo), podendo ser algas verdes e/ou cianobactérias.

O talo líquênico permite a classificação morfológica dos líquens em crostosos, foliosos, fibrosos e fruticosos (Budel & Scheidegger, 1996; Oksanen, 2006). A reprodução dos fungos liquenizados ocorre por dispersão de esporos, seguida da associação ao fotobionte, ou por propágulos, fragmentos do talo contendo micobionte e fotobionte (Budel & Scheidegger, 1996). Sua ampla distribuição deve-se à alta adaptabilidade, permitindo sua fixação em substratos como folhas (foliícolas), solo (terrícolas), rochas (saxícolas) e cascas de árvores (corticícolas) (Boch *et al.*, 2013).

A adaptação das espécies foi favorecida pelo metabolismo secundário das cianobactérias associadas, garantindo vantagens ecológicas para sua manutenção (Honda & Vilegas, 1999). Além disso, esses metabólitos auxiliam na classificação taxonômica dos líquens, especialmente quando a diferenciação morfológica é limitada. Técnicas como testes com reagentes específicos e cromatografia de camada delgada são eficazes na detecção de compostos químicos característicos de determinados grupos, contribuindo para sua identificação e caracterização (Yousuf *et al.*, 2014).

Demais compostos que naturalmente não são produzidos pelo micobionte ou pelo fotobionte podem ser acumulados nas estruturas do talo devido ao excesso disperso no ar atmosférico do habitat em que o líquen se encontra, geralmente ocasionado pela atividade antrópica. Devido a este potencial de acumulação, diversos estudos foram elucidados para

o uso destes grupos para o biomonitoramento, onde dispõe-se de avaliações analíticas de metais e semimetais encontrados nas amostras, aliado ao acompanhamento da vitalidade dos espécimes monitorados. (Martins *et al.*, 2008; Saiki *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2018). A ilha de Upaon-Açu, por exemplo, dispõe da distribuição de 6 estações que visam quantificar poluentes definidos como obrigatórios pela Resolução n°491 do CONAMA, sendo eles: Material Particulado (MP10 e MP2,5), Ozônio (O3), Monóxido de Carbono (CO), Dióxido de Nitrogênio (NO2), Dióxido de Enxofre (SO2), e Partículas Totais em Suspensão – PTS. A avaliação estabelecida a partir do padrão de distribuição, no entanto, não se faz eficiente para a predição da qualidade do ar, principalmente para a área que abrange a capital Maranhense, haja visto que as fontes de dispersão de poluentes não se concentram somente no setor industrial da ilha (Pinheiro *et al.*, 2020).

A disposição de organismos vivos para o monitoramento ambiental - de forma específica o uso de líquens - permite a detecção precoce de desequilíbrio ecológicos concentrados no ar atmosférico, guiados principalmente pelo nível de tolerância que é estabelecido para a saúde pública. Ademais, considera-se a economia de implementação e monitoramento destes organismos quando comparadas a sistemas tecnológicos já aplicados. Com a utilização de organismos bioindicadores é possível ainda reconhecer compostos em níveis que os sistemas convencionais não analisam, além de promover avaliação em áreas de difícil acesso e contribuir para educação e conscientização ambiental. (Buss *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2008).

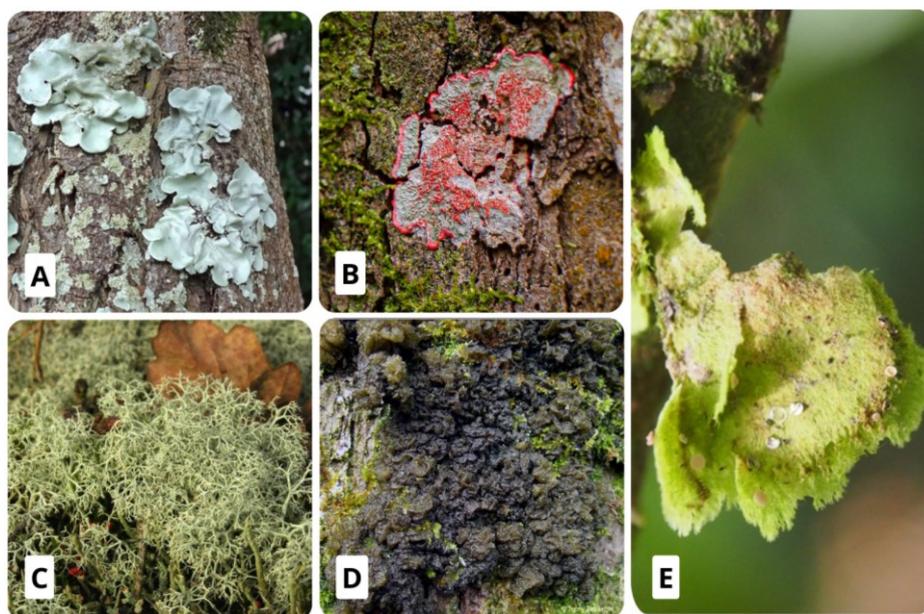
## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2. 1. Simbiose líquênica**

A definição de líquen consiste na associação mutualística estabelecida entre microrganismos fotossintetizantes, classificados como ficobiontes e cianobiontes quando apresentam algas verdes e/ou cianobactérias, respectivamente, e fungos liquenizados (micobionte). Apesar da morfologia do talo ser definida pelo fungo, o fotobionte (microrganismos fotossintetizantes) tem influência no morfotipo pois somente a partir do estabelecimento da simbiose é que há o desenvolvimento do corpo vegetativo. (Thomas & Nash, 2008).

A simbiose líquênica pode ser encontrada nos mais variados ambientes, como florestas tropicais, regiões polares e porções aquáticas (de modo submerso ou nos arredores), seja de água doce ou salgada. (Spribille *et al.*, 2022). Em muitas regiões os líquens compõem quantidades significativas da biomassa e, por se adequarem a condições

muito específicas, são utilizados como bioindicadores (González *et al.*, 2023; Nimiset *al.*, 2002). Estes ainda são classificados de acordo com o percentual de fixação no substrato somado a morfologia do talo (**Figura 1**), onde são destacados os três principais tipos: Crostoso - Totalmente aderido à superfície; Folioso - Preso ao substrato somente em alguns pontos e ramificado; Fruticoso - Talo desenvolvido de forma plana ou em forma de fios. (Thomas & Nash, 2008; Sanders, 2001).

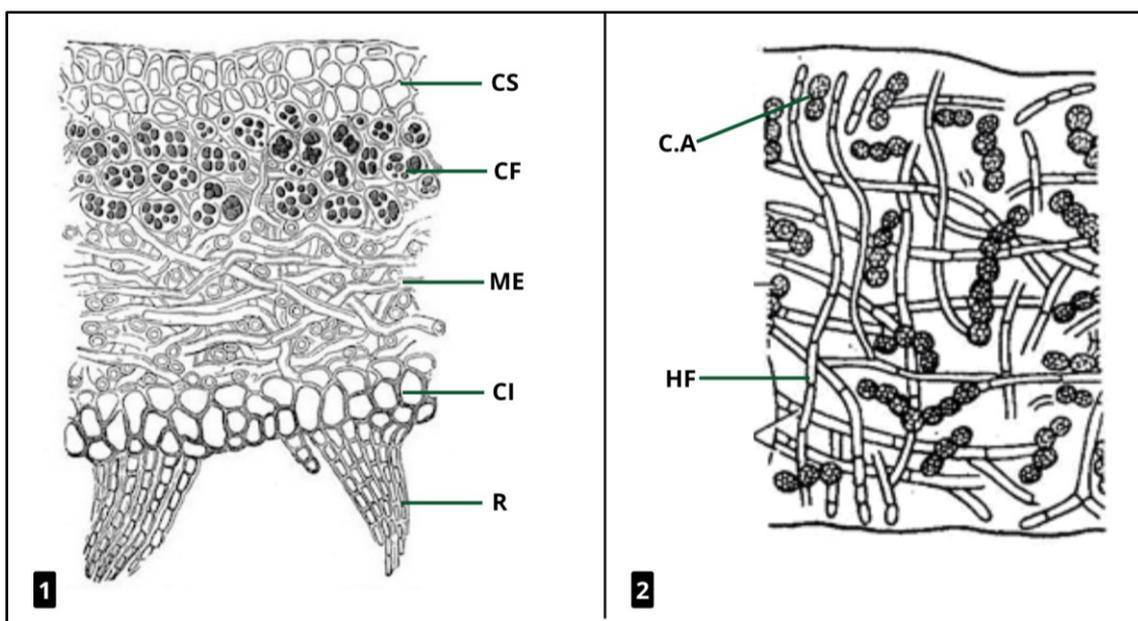


**Figura 1:** Morfologias do talo liquênico. **A:** Talo folioso - *Parmotrema sp.* **Fonte:** Cristina Braga; **B:** Talo crostoso - *Cryptothecia rubrocincta.* **Fonte:** Rafael Vila Nova; **C:** Talo Fruticoso - *Cladonia portentosa.* **Fonte:** JC Schou; **D:** Talo gelatinoso - *Leptogium sp.* **Fonte:** John Douglass; **E:** Talo filamentoso - *Coenogonium sp.* **Fonte:** Lena Struwe.

A característica de colonização de substratos específicos também sugere classificação, podendo ser dos principais tipos: foliícola (crescem sobre superfície de folhas), terrícolas (fixados no solo), saxícolas (crescem sob rochas) e corticícolas (crescem sob a superfície de vegetais superiores) - sendo que este compreende a maioria dos tipos de fungos liquenizados. (Brodo, 2001). As espécies que se desenvolvem bem em ambientes luminosos são classificadas como heliófilas, já as umbrófilas correspondem às espécies que normalmente crescem em ambientes sombreados. (Lemos *et al.*, 2007).

Após o estabelecimento da simbiose é que o talo é definitivamente desenvolvido, podendo apresentar apenas duas ou mais camadas estruturais (**Figura 2**). O talo heterômero é caracterizado pela presença de córtex superior e inferior, camada de fotobionte, rizinas e medula; já o corpo vegetativo (talo) do tipo homômero não se difere

em camadas, onde as hifas do fungo liquenizado e o fotobionte estão diretamente ligados. (Thomas & Nash, 2008). Em caso de segmentação, o córtex superior protege a camada de fotobiontes que é localizada abaixo, retardando a evaporação e filtrando a radiação que o líquen recebe. O córtex inferior muitas vezes media a troca gasosa e as rizinas são as estruturas responsáveis pela fixação do organismo no substrato. (Sanders, 2001).



**Figura 2:** Segmentação de talo liquênico. 1- Taló heterômero (CS: Córtex superior; CF: Camada de fotobiontes; ME: Medula; CI: Córtex inferior; R: Rizinas), 2 - Taló Homômero (CA: Células de algas; HF: Hifas fúngicas). Fonte: LibreTexts. Adaptado.

A grande maioria de ascomicetos formadores de líquen se reproduzem por meio de ascósporos, no entanto, a dispersão vegetativa é recorrente em estado simbiótico por meio da fragmentação do talo. (Thomas & Nash, 2008). De forma alternativa certas linhagens realizam a dispersão por meio de sorédios, que são grânulos de tamanhos variados compostos por fragmentos de hifas e células de algas e produzidos por estruturas denominadas soralia. Os isídios são propágulos vegetativos que formam protuberâncias que podem ser facilmente retiradas do talo liquênico para a dispersão. Em caso de espécies em que o meio de reprodução se dá principalmente por fragmentação do talo, a formação de estruturas produtoras de esporos é escassa ou inexistente. (Grube & Wedin, 2016).

## 2.2. Fungos liquenizados

Os Fungos liquenizados (ou micobiontes) correspondem aos representantes eucariotos encontrados em associação com algas verdes e/ou cianobactérias, de forma exclusiva ou não. Os fenótipos do organismo liquênico são principalmente estabelecidos pelo micobionte, bem como a definição da área de fixação e processo reprodutivo. Cerca de 20% das espécies conhecidas de fungos são formadores de líquen, onde estes se subdividem principalmente entre os filos Ascomycota e Basidiomycota, além de alguns fungos anamorfos (Divakar, P.K., *et al.*, 2017, Hawksworth & Lucking, 2017). Em sua maioria, os ascomicetos são reconhecidos em 98% das associações, sendo que cerca de 20.000 (31,25%) espécies inseridas neste filo fazem parte da biodiversidade que é a comunidade liquênica. (Lumbsch, H.T. & Leavitt, S.D. 2018).

A taxa significativa da abundância destes organismos fúngicos para a comunidade se deve principalmente à reprodução destes, podendo dispersar-se por meio da germinação de esporos ou via propágulos vegetativos que contém o principal fotobionte da associação. (Divakar, P.K. *et al.*, 2017, Budel & Scheidegger 2008). Quando sexuada, a dispersão ocorre por meio da produção de esporos, do qual é caracterizada pela estrutura reprodutiva em formato de saco denominada “asco”. A expressão desta característica no talo liquênico se dá pelo desenvolvimento de ascocarpo/ascoma (corpo reprodutivo), caracterizado morfológicamente como apotécio (quando assemelha-se ao formato de taça), peritécio (em forma de frasco) ou cleistotécio (normalmente esférico e fechado). A reprodução assexuada ocorre por meio de conídios (esporos assexuados) formados em estruturas denominadas conidióforos. (Lumbsch, H.T. & Leavitt, S.D. 2018; Thomas & Nash, 2008).

A diversificação dos líquens por meio de basidiomicetos corresponde a menos de 1% das espécies identificadas. (Lucking *et al.*, 2017). Normalmente estes apresentam estruturas mais simples quando comparado ao que se tem caracterizado atualmente, como o desenvolvimento de talos crostosos estabelecidos sob superfícies rochosas ou em troncos de árvores. (Hodkinson B.P. & Lendemer J.C., 2011). Como principal característica do filo Basidiomycota, os fungos produzem esporos denominados basidiósporos, produzidos em basídios (estrutura em forma de bastão). (Lawrey & Diederich 2003).

Os fungos liquenizados foram anteriormente classificados como um único grupo taxonômico – Lichenes – pertencente ao reino fungi (1981). Por meio do Código de Nomenclatura Botânica, o referido grupo passou a ser descrito como Fungos

Liquenizados e reconhecido como grupo biológico, onde são estudados os mecanismos fisiológicos únicos, como a produção e aproveitamento de subprodutos e outras características ligadas à ecologia vegetal (Sancho & Pintado, 2004). Atualmente destaca-se Parmeliaceae como a família mais diversa entre os fungos liquenizados que estão distribuídos em cerca de 80 gêneros e 2700 espécies conhecidas (Thell *et al.*, 2012).

A diversidade taxonômica dos líquens pode ser mensurada a partir do micobionte além da caracterização de estruturas morfológicas. Estudos voltados para a classificação de substâncias liquênicas tornaram-se uma ferramenta potencial de identificação, haja visto a gama de compostos químicos produzidos por fungos quando liquenizados. (Yamamoto, Y. *et al.*, 2015) A concentração dos compostos derivados de vias do metabolismo secundário pode variar de 0,1 a 10% do peso seco do talo. Embora muitos dos compostos presentes sejam da classe de ácidos graxos e compostos aromáticos (depsídeos e depsidonas, derivados fenólicos) e sejam em sua maioria produzidos pela alga verde, alguns destes são sintetizados pelo micobionte e tidos como exclusivos para os líquens. (Honda & Vilegas, 1999).

### **2. 3. Microrganismos fotossintetizantes**

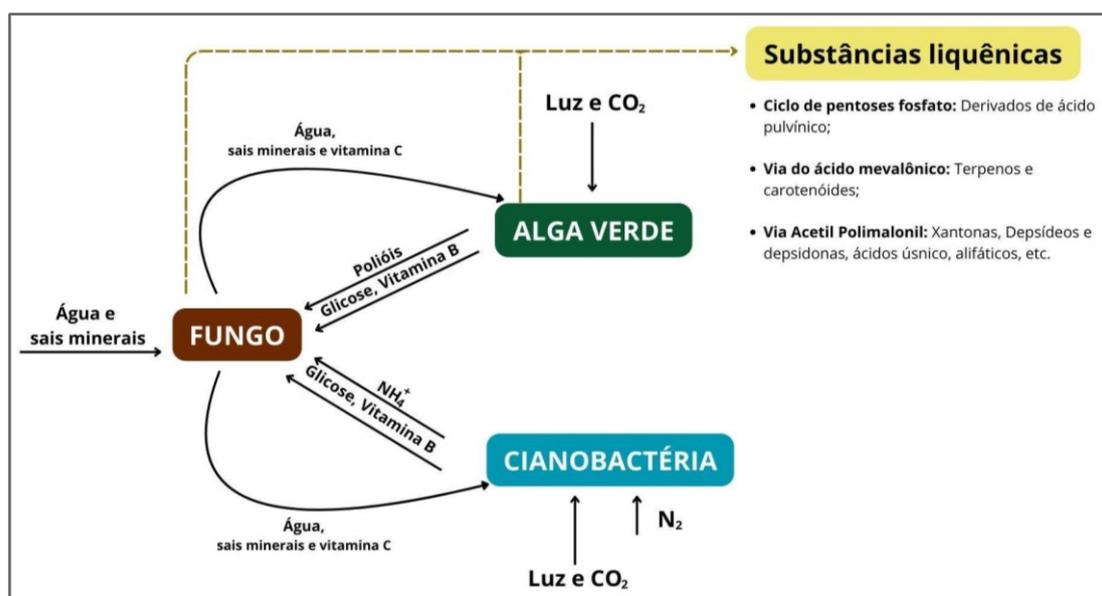
As algas verdes, quanto microrganismos, compõem um grupo amplo de seres unicelulares e fotossintetizantes, que, com o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera, tornou-se um importante objeto de estudo que visou a capacidade de fixação de gases e conversão em biomassa. Em 1973 F.E Round propôs a classificação destes microrganismos fotossintetizantes com base na presença ou ausência de núcleo verdadeiro, organelas ligadas à membrana e relação filogenética, onde foram estabelecidos dois grupos: 1. Prokaryota, contendo um único filo-Cyanophyta; 2. Eukaryota, representado por 12 filos- Euglenophyta, Chlorophyta, Charophyta, Prasinophyta, Xanthophyta, Haptophyta, Dinophyta, Bacillariophyta, Chrysophyta, Phaeophyta e Rhodophyta.

Em anos posteriores foram propostas outras classificações, voltadas principalmente para os representantes eucariontes, no entanto, a referida classificação ainda é utilizada e serve para desmistificar o termo “microalga” que não sugere divisão taxonômica dos microrganismos fotossintetizantes. (Sahoo & Seckbach, 2015). A evolução estimada em bilhões de anos desses organismos é refletida na diversificação de processos fisiológicos e morfológicos. Devido tal histórico, a caracterização/classificação que foi e ainda é sugerida se torna difícil quando baseada somente em aspectos estruturais,

bem como o que normalmente ocorre para os sistemas de classificação botânica e de microbiologia. (Komárek *et al.*, 2014).

Grande parte das associações (90%) com microrganismos fotossintetizantes dizem respeito à presença de microalgas (eucariotos), onde foram descritos entre 25 e 28 gêneros. (DePriest, 2004). Os ficobiontes - nomenclatura específica para fazer referência às algas verdes em simbiose líquênica - compartilham de características filogenéticas e bioquímicas com plantas terrestres, como a presença de clorofila a e b. (Bold & Wynne, 1985; Hoek *et al.*, 1955). Segundo Honda e Vilegas (1999), componentes como vitamina B são frutos de etapas fotossintéticas do fotobionte presente no talo. Quando presentes no talo, as algas verdes em geral são responsáveis pela produção de açúcares (glicose, sacarose, trealose, entre outros), bem como o que ocorre em plantas superiores. (Figura 3).

As cianobactérias quando definidas como parceiro fotossintetizante primário na associação líquênica, fornecem açúcares decorrentes do ciclo fotossintético. (Kaasalainen *et al.*, 2012). Além disso, há o fornecimento de compostos de amônia, nitrato ou nitrito que podem ser absorvidos pelo parceiro fúngico para a síntese de aminoácidos e proteínas. (Figura 3). A capacidade de fixação de nitrogênio presente na atmosfera é exclusiva destes fotobiontes devido a presença de heterocisto (célula especializada) através da via metabólica da enzima nitrogenase. (Rai *et al.*, 2002; Sivonen, K. 2009).



**Figura 3:** Substâncias absorvidas e produzidas na simbiose líquênica. Fonte: VAN HALUWYN *et al.*, (2009), PD CRITTENDEN (1991), adaptado.

Apesar de constituírem um grupo de distribuição diversa, alguns gêneros, especialmente de cianobactérias, não teriam sucesso reprodutivo em condições terrestres específicas. A associação com outros organismos permite a ampliação das áreas de ocupação, que é o que ocorre quando estão intimamente ligados aos fungos. (Tschermak-Woess, 1988). Cerca de 40 gêneros de algas (em sua maioria do filo Chlorophyta) e cianobactérias foram registrados em simbiose liquênica, onde *Trebouxia* e *Trentepohlia* são as algas verdes mais recorrentes. *Nostoc* e *Scytonema* são os representantes procariotos mais frequentes, presentes em cerca de 1.500 das espécies de líquen já descritas, como fotobionte primário ou não. (Rikkinen, Jouko. 2002. Friedl & Budel, 1992).

A diversidade de algas verdes/azuis inseridas em simbiose liquênica sugere que o estabelecimento de parceiros é adaptável, além de indicar o potencial de autossustentabilidade destes. (Hawksworth & Grube, 2020). A diversificação de espécies tende a ser estudada além de caracteres morfológicos, como por meio das substâncias que são produzidas. Como reflexo da relação simbiótica, os microrganismos em condição de vida livre apresentam perfil de produção distinto destas substâncias derivadas do seu metabolismo secundário, haja visto a definição de certas vias metabólicas como exclusivas da associação. (Honda & Vilegas, 1999).

#### **2. 4. Caracterização química dos líquens**

Muitos dos caracteres úteis utilizados para a classificação dos líquens são homoplásticos, ou seja, apresentam características semelhantes em organismos não geneticamente próximos e que são frutos principalmente da adaptação ao meio. (Upreti *et al.*, 2015). Sendo assim, quando o estudo dos caracteres morfológicos não é suficiente para a taxonomia, os dados moleculares e químicos ajudam na identificação/caracterização e definição da posição filogenética, especialmente para os fungos liquenizados do filo ascomycota, que compreende a maioria dos representantes em associação. (Schoch *et al.*, 2009).

As substâncias liquênicas são normalmente divididas em metabólitos primários e secundários, sendo o primeiro citado associado diretamente aos processos essenciais de respiração, fotossíntese e nutrição. Neste caso, o fungo liquenizado tem o papel de absorver os nutrientes oriundos do substrato fixado e de modo consequente absorve os contaminantes presentes no ar atmosférico. (Upreti *et al.*, 2015). Os ficobiontes sintetizam os nutrientes a partir do CO<sub>2</sub> e os cianobiontes produzem amônio por meio da

fixação de nitrogênio. Em outras regiões, como áreas desérticas, outras formas de vida são sustentadas pelos compostos nitrogenados fornecidos pelos líquens (Thomas & Nash, 2008).

Os metabólitos secundários são produzidos para assistência de mecanismos essenciais e ecológicas, como estratégia de defesa contra herbívora e até mesmo para competição com outras espécies por recursos, como luz e o próprio habitat. (Hale. M. E. 1983; Upreti, 2015). Estas substâncias têm sido alvo de muitas indústrias voltadas para a produção de alimentos, fármacos, cosméticos, entre outros, por apresentarem potencial biotecnológico e conterem um ótimo custo benefício quanto recurso biológico. (Shibata Shoji, 2009; Latkowska *et al.*, 2015). São geralmente situados no córtex e medula, raramente encontradas em ambas as camadas.

Estudos pioneiros, como os de William Nylander no século XIX, Friedrich Wilhelm Zopf (1907) e pesquisadores japoneses Asahina e Shibata (1954), desempenharam um papel fundamental na exploração da diversidade química dos líquens (Vitikainen Orvo, 2001; Yousuf *et al.*, 2014). Dentre as contribuições dessas pesquisas, destaca-se a identificação da presença de metabólitos secundários no talo liquênico, cuja concentração pode variar entre 0,1% e 10% do peso seco, dependendo da espécie e das condições ambientais (Upreti, 2015).

Com o aprimoramento de técnicas de espectrometria e cromatografia voltadas para identificação e quantificação de compostos, foram reconhecidas cerca de 1.050 substâncias liquênicas até o ano de 2012 (B. Thippeswamy ,et.al 2012) É plausível, no entanto, que o levantamento de dados acerca destas substâncias tenha aumentado devido aos avanços nas técnicas analíticas e à ampliação das investigações sobre metabólitos secundários. A limitação de dados disponíveis, eventualmente associada à escassez de estudos em determinadas regiões e à concentração das pesquisas em áreas geográficas específicas, restringe a compreensão da diversidade química dos líquens (Fritis *et al.*,2013).

Como produtos da etapa de fotossíntese realizada pelo principal fotobionte, são fornecidos para o talo compostos polióis (ex. glicerol, ribitol e eritritol) e açúcares (sacarose, glicose, etc.). Há ainda o relato de identificação de aminoácidos livres e que compõem as proteínas presentes, isolados em *Collema* e *Leptosporum* no estudo de Mendes (1994). Produtos acumulados na porção de medula e córtex do talo são secretados a partir do metabolismo secundário dos microrganismos, a partir da via do acetil-

polimalonil, conduzindo a formação de compostos fenólicos, ácidos e derivados. ((Shibata Shoji, 2009.; Luckner, M.; 1990; Mosbach, K. 1973).

Foram elucidados ainda estudos de quimiotaxonomia onde técnicas de reação de coloração, microcristalização, cromatografia e espectrometria trazem à tona dados cruciais sobre as espécies trabalhadas, bom como abordado por Hengameh Parizadeh e Rajkumar H Garampalli (2017). Testes iniciais de contato com os reagentes 1- Solução de Hidróxido de Potássio, 2- Hipoclorito de sódio, 3- p-Fenilenodiamina (PD) e 4- Solução de Iodo detectam a presença de substâncias específicas presentes em cloroliquens por meio de reações de coloração. A depender do padrão de coloração observado, o uso do referido teste preliminar guia para interpretações precisas de resultados para procedimento experimental de cromatografia. (Brodo Irwin, 2003; Le Pogam *et al.*, 2015).

#### **2. 4. 1 Cromatografia de Camada Delgada**

O uso da Cromatografia de Camada Delgada - CCD (Thin Layer Chromatography - TLC) é amplamente empregado na análise de metabólitos secundários produzidos por liquens, permitindo a separação desses compostos com base na diferença de polaridade. A técnica apresenta diversas vantagens, como a utilização de pequenas quantidades de amostra e solventes, além da possibilidade de analisar várias amostras simultaneamente, tornando o procedimento eficiente e econômico. O perfil químico obtido por meio da CCD facilita a identificação de espécies, mesmo em casos de isomorfia, onde diferentes espécies apresentam morfologia semelhante, mas composição química distinta.

Além de sua aplicação taxonômica, a CCD fornece informações valiosas sobre fatores ecológicos associados aos liquens, como a presença de ácidos que desempenham papéis na defesa contra herbivoria ou microrganismos, bem como a tolerância a condições ambientais adversas. A concordância dos dados obtidos pela CCD com outras técnicas experimentais reforça sua confiabilidade e importância na caracterização de liquens, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre esses organismos e suas interações com o ambiente. (Silva *et al.*, 2012; De Oliveira Villarouco, 2007)

#### **2. 5. Poluição ambiental e liquens como bioindicadores**

Muitos dos gêneros de fungos comumente liquenizados demonstram ter preferência na escolha de parceiros fotobiontes onde, atribuído à esta seletividade, desempenham condições singulares de adaptação. Por outro lado, no entanto, a ausência

destas particularidades permite que o organismo se estabeleça em ambientes distintos e de condições extremas (Osyczka *et al.*, 2021). A ocupação de líquens nestes habitats reflete diretamente a condição local, podendo serem avaliados diferentes aspectos visando sua abundância, o desenvolvimento e a taxa de produção de compostos químicos. (Honda & Vilegas, 1999).

A biologia dos líquens está diretamente relacionada à sensibilidade a poluentes que podem estar presentes no ar atmosférico. Devido a fonte de nutrição ser baseada em compostos encontrados de forma suspensa, o grau de pureza do ar interfere diretamente na densidade populacional destes organismos. (Maki *et al.*, 2013). Gêneros como *Heterodermia* Trevis., 1868, *Physcia* (Schreb.) Michx., 1803, *Teloschistes* Norman, *Canoparmelia* Elix & Hale, 1986, *Usnea* Dill. ex Adans., 1763 e *Parmotrema* A.Massal., 1860 são abordados em estudos nacionais que concentram os experimentos para o biomonitoramento local e uso de agentes biológicos como meio para inferir a qualidade do ar. (Coccaro & Saiki 2001; Martins *et al.*, 2008).

O monitoramento da qualidade do ar e aplicação de métodos indicativos são de extrema relevância pois geram dados sobre as condições ambientais e provocam aplicação de políticas públicas voltadas para assegurar boas condições, haja visto que a poluição atmosférica é resultado de diversas práticas antrópicas que tornam o ar nocivo à saúde. (Vormittag *et al.*, 2021). No Brasil estudos realizados apontaram que diversas cidades não apresentam níveis estabelecidos como seguros para a qualidade do ar, dados estes corroborados pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) que esclarece que cerca de 51 mil mortes anuais de brasileiros estão associadas ao nível de toxicidade do ar. (Ann Glob Health. 2019; Landrigan *et al.*, 2018 ).

A resolução 491/2018 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) oferece parâmetros de classificação da qualidade do ar em concentrações ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) de poluentes, como dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio, gás carbônico, ozônio, MP10 (poluentes visíveis a olho nu) e MP2,5 (partículas finas). A interpretação dos valores que são expressos está ligada aos riscos que a população pode ou não correr, afetando desde pessoas do grupo sensível à toda população, acarretando a manifestação de doenças respiratórias e cardiovasculares.

O estudo realizado por Pinheiro *et al.* (2020) teve como objetivo analisar os parâmetros relacionados à poluição atmosférica em São Luís, capital do estado do Maranhão. A partir da obtenção de dados coletados nas sete estações automáticas de monitoramento da qualidade do ar, foi possível comprovar o excesso de cargas poluentes

na estação localizada na zona portuária do município. Além disso, observou-se que a influência dos ventos alísios contribuiu para elevações significativas nos índices de poluição atmosférica, resultando em um aumento de 24,5% na concentração de Partículas Não Respiráveis e de 35% nas Partículas Totais em Suspensão. Esse fenômeno ocasionou a dispersão dessas partículas para outras regiões da cidade, ampliando os impactos ambientais associados à poluição do ar.

Considerando a variação local das concentrações de poluentes no ar atmosférico e a tendência de agravamento da qualidade do ar, se faz necessário o constante monitoramento e aplicação de ações que reduzam os possíveis impactos. Em relação aos métodos tradicionalmente aplicados, o biomonitoramento e o uso de bioindicadores para a qualidade do ar não dependem de altos custos para o estabelecimento e manutenção, além de que demonstram resultados igualmente eficientes. Com isso, é possível ainda estabelecer parâmetros de identificação que guiam para a formação de soluções que amenizam ou combatem as fontes de desordens provocadas aos organismos biológicos.

No estado do Maranhão poucos estudos concentram o uso de líquens como bioindicadores da qualidade ambiental, e estes ainda são voltados somente para as regiões do interior do estado. (Silva *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2021; Cunha *et al.*, 2015). Além disso, poucos são dados registrados sobre parceiros simbióticos pertencentes à comunidade líquênica e seu potencial biológico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Caracterizar a nível morfológico e químicos líquens encontrados na região metropolitana de São Luís.

#### **3.2 Específicos**

- Obter espécimes de líquens em pontos de alto, moderado e baixo impacto ambiental;
- Realizar levantamento de estruturas morfológicas para identificação taxonômica;
- Determinar a composição química dos espécimes coletados por meio de testes pontuais de reação e análise qualitativa;
- Identificar os níveis de acumulação de microplásticos em líquens de cada unidade amostral.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Caracterização da área de estudo e pontos de coleta

O estudo foi desenvolvido no município de São Luís, localizado na porção Norte do Estado do Maranhão, região Nordeste do Brasil (IBGE, 2014). As áreas de coleta compreenderam áreas de proteção ambiental, parques ambientais e regiões de fluxo populacional contínuo (**Figura 4 e 5**).



**Figura 4:** Localização da cidade de São Luís, Maranhão, Brasil.

1. O Parque Estadual do Sítio do Rangedor, gerido pela Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Naturais (SEMA), corresponde a uma área de 120.955 hectares, com coordenadas gerais 581184.67 /9723870.40. A vegetação é descrita como fragmento remanescente de Floresta Amazônica(bioma), com diferentes estágios de sucessão ecológica, funcionando como reguladora térmica em um ambiente que possui um crescimento urbano acentuado. A expressão mais significativa da diversidade de fauna é voltada para organismos invertebrados e para avifauna, contendo ainda representantes de herpetofauna e mastofauna. No local são desenvolvidas atividades voltadas para educação ambiental e visitação. Ocorrem ainda atividades conflitantes como caça e retirada de vegetação ilegal, depósito de resíduos sólidos e despejo de sanitários irregulares. (SEMA/SBAP, 2017)

2. O Parque Estadual do Bacanga tem área estimada em 2973,927 hectares e tem como órgão gestor a Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Naturais (SEMA). O estabelecimento da área de proteção objetiva legalmente conservar e preservar manancial subterrâneo e corpos hídricos superficiais, além da fauna e flora que corresponde ao ecossistema de floresta pré-Amazônia. Nesta área os pontos de coleta correspondem ao Sítio do Físico, área conservada de forte atuação na educação ambiental e ações comunitárias na região Itaqui-Bacanga; estão incluídos ainda o Sítio Mangalho (área restrita e conservada) e Instituto Federal do Maranhão IFMA- campus maracanã. (SEMA, 2001)

3. O centro histórico de São Luís, localizado na Baía de São Marcos, abriga tecidos urbanos históricos e preservados, sendo crucial para a inscrição da capital maranhense como Patrimônio Mundial e tombada pelo IPHAN (Instituto Patrimônio Histórico e Artístico Nacional). A área será utilizada como principal que abriga um fluxo populacional contínuo, sendo referência de atividades antrópicas para o presente estudo.



**Figura 5:** Áreas estabelecidas para coleta. 1- Sítio do Físico (Parque estadual do Bacanga); 2- Parque estadual Sítio do Rangedor; 3- Centro histórico (Praças Benedito Leite e João Lisboa). Fonte: Google earth, adaptado.

#### 4.2. Coletas e armazenamento

As coletas foram realizadas entre os meses de agosto e outubro de 2024, em amostragem única entre os períodos de final da estiagem e início da seca. A coleta foi realizada com autorização de órgão gestor de unidade de conservação, emitido pela Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Naturais do Estado do Maranhão, para atividades com finalidade científica dentro do projeto “LiMaBio- BR- Metadiversidade de Líquens como Bioindicadores e Fontes de Biomoléculas”, vinculado ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

As amostras foram obtidas de acordo com as recomendações de British *et al.*, 1996 para as diferentes morfologias do talo liquênico e o substrato em que está fixado.

Foram utilizadas ferramentas cortantes como, faca e estilete para líquens corticícolas, martelo e cinzel para os que se encontrarem em rochas e pá para os de substrato inconsolidado. A coleta de líquens foliosos foi realizada à mão livre devido à pouca aderência ao substrato. Ainda em campo, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e etiquetadas com as informações da coleta (código que referencia o local e número de amostra). Em laboratório, os espécimes mantidos em armazenamento foram separados em alíquotas para direcionamento de procedimentos químicos e de análise de caracteres morfológicos.

### **4.3. Caracterização morfológica e identificação**

A análise das estruturas líquênicas foram realizadas através de Microscópio Estereoscópio Trinocular DI- 152T (DIGILAB, TrayCommerce), com anotação de estruturas que guiam a identificação a nível de gênero: tipo de corpo vegetativo, tipos de apotécio (estrutura e fixação), presença de sorédios e isídios, coloração de córtex superior e inferior. Foram utilizados estudos taxonômicos como Honda, 1997, Jungbluth, 2006 e 2010; Spielmann, 2005 e 2009.

### **4.4. Caracterização química**

#### **4.4.1. Reações de coloração**

Os testes pontuais de coloração foram realizados utilizando os reagentes e interpretando resultados segundo Orange, A. *et al.* (2001) aplicado em âmbito laboratorial:

- Hidróxido de Potássio (10%)
- Hipoclorito de Sódio
- KC
  - Reagentes primários combinados no ato do contato

Para a deposição das substâncias químicas no talo líquênico, realizou-se o contato na porção superior do corpo vegetativo (Córtex superior) e Medula. As reações foram observadas em Microscópio Estereoscópio Trinocular DI-152T (DIGILAB, TrayCommerce).

#### **4.4.2. Identificação de substâncias líquênicas**

A determinação dos produtos líquênicos ocorreu por meio do procedimento de Cromatografia de Camada Delgada de acordo com Culberson, C. F. (1972) e Orange, A. *et al.* (2001). As amostras de líquen foram acondicionadas utilizando acetona para

extração de metabólitos durante o período de 48h. O extrato obtido foi aplicado sobre placas de alumínio revestidas com sílica gel com auxílio de capilar. Em seguida, as placas foram então colocadas em um tanque selado, contendo solução C- 170:30 → Tolueno/Ácido acético.

Após a separação dos compostos por meio do percurso por absorção solvente através da camada de sílica gel, as substâncias tornam-se visíveis por meio da pulverização - placa de aquecimento em 100°C por - da placa com ácido sulfúrico (10%). As manchas resultantes são provisoriamente identificadas pela combinação de sua cor e posição relativa na placa. A exposição de luz UV para as placas de alumínio foi aplicada antes e após o procedimento de aquecimento da mesma.

#### **4.4.3. Avaliação da deposição de microplástico**

Para a análise dos níveis de acumulação de microplásticos, parte das amostras foi deixada para secar em temperatura ambiente por 24 horas. Após a secagem, as amostras foram distribuídas em béqueres para a preparação das alíquotas. Em seguida, as amostras foram pesadas nos béqueres e submetidas individualmente ao método de digestão com peróxido de hidrogênio, conforme o protocolo adaptado de Matsura *et al.* (2015).

De acordo com os dados apresentados por Taurozziet *et al.* (2024), para cada 1 g de amostra, devem ser adicionados 40 mL de cada um dos componentes da solução de digestão. No entanto, algumas amostras apresentaram biomassa insuficiente para essa proporção. Nesse caso, as concentrações das soluções de ferro (II) 0,05 M e peróxido de hidrogênio foram ajustadas conforme a quantidade de biomassa disponível (**Quadro 1**), mantendo a proporção recomendada para a digestão. Todas as soluções que foram utilizadas foram filtradas e armazenadas em vidrarias a fim de evitar possíveis contaminações.

**Quadro 1:** Identificação e caracterização morfológica de espécimes coletados.

ID	Táxon	Peso (g)	Concentração FeSO4 (mL)	Concentração H2O2 (mL)
R8	<i>Parmotrema</i> A., massal 1860	0,1522	6	6
C4.1	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	0,0502	2,03	2,03
SF12	<i>Leptogium</i> (Ach.) Gray, 1821	1	40	40

Inicialmente, foi adicionada a solução de FeSO<sub>4</sub> às amostras, seguida da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As amostras foram então deixadas para digestão em uma capela, a temperatura ambiente, por 28 minutos. Após esse período, todas as amostras foram aquecidas entre 40-50°C. Durante o processo, as amostras começaram a precipitar e foram retiradas da chapa de aquecimento, com a adição de água destilada, a fim desacelerar a digestão. A redução de resíduos orgânicos foi retomada em seguida de cada interrupção com a adição de 50% do volume de peróxido de hidrogênio. Esse procedimento de desaceleração foi aplicado em triplicada até a digestão estar completa.

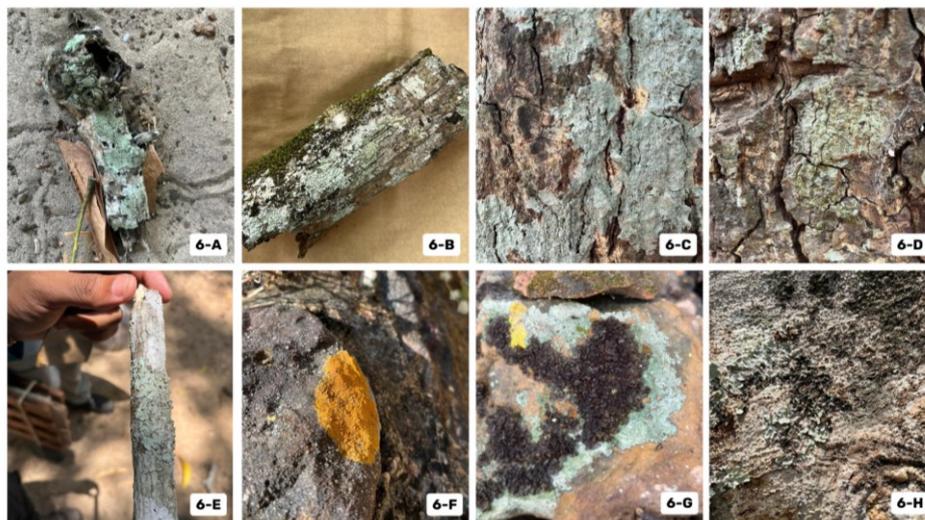
Ao final do processo, as amostras foram filtradas a vácuo usando papéis de filtro de fibra de vidro e coradas com 1 mL de rosa de bengala. Após o processamento, as alíquotas foram transferidas para placas de Petri e analisadas sob estereomicroscópio para a identificação dos poluentes, conforme descrito por Taurozziet *et al.* (2024). Características como tipo, cor e tamanho das fibras foram analisadas para categorizar os microplásticos observados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

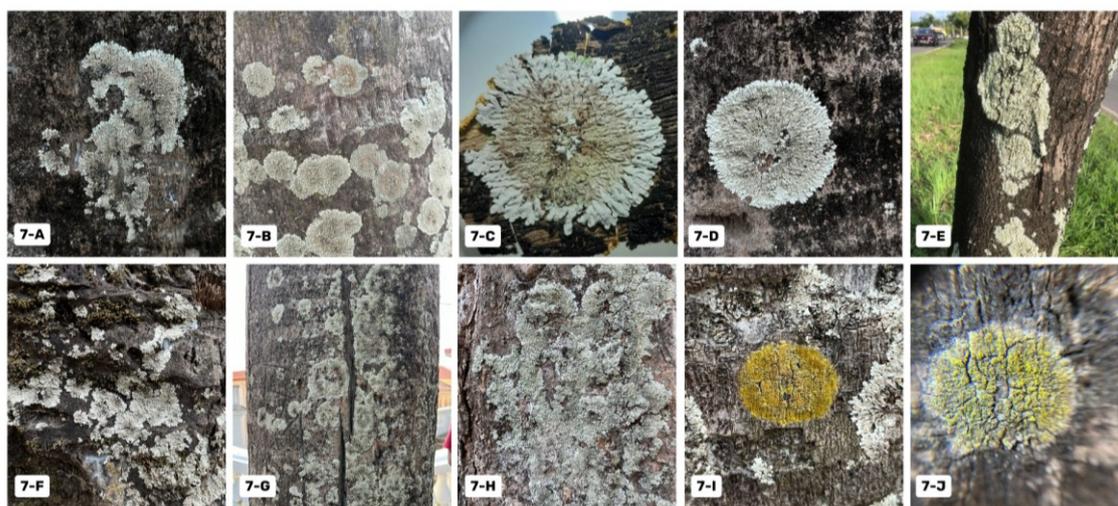
Com base na metodologia aplicada, foi possível coletar um total de 29 espécimes de líquens, provenientes de diferentes localidades. Desse total, 13 amostras foram obtidas no Sítio do Físico (**Figura 6**), 12 no Centro Histórico (**Figura 7**) e 4 no Parque Estadual Sítio do Rangedor (**Figura 8**), evidenciando uma distribuição representativa entre os diferentes ambientes estudados.

A maior parte dos líquens foi encontrada em troncos de árvores, sendo caracterizados como corticícolas, reforçando o papel importante desse substrato na colonização e desenvolvimento desses organismos. Além disso, foram observados outros hábitos de fixação, como em rochas e superfícies artificiais, demonstrando a adaptabilidade dos líquens a diferentes condições ambientais.

Algumas amostras, no entanto, foram excluídas das análises seguintes devido a insuficiência de material, o que impossibilitou a identificação adequada, ou porque pertenciam a outros grupos de organismos que apresentam semelhanças morfológicas com os líquens, como as briófitas. Essa etapa de exclusão foi essencial para garantir a precisão dos dados e a consistência na identificação dos espécimes.



**Figura 6:** Líquens coletados no Sítio do Físico (Parque Estadual do Bacanga). A- SF01; B- SF03; C- SF04; D- SF07; E- SF10; F- SF11; G- SF12; H- SF13.



**Figura 7:** Líquens coletados no Centro Histórico de São Luís. A- C01; B- C02; C- C03; D- C04; E- C05; F- C06; G- C07; H- C08; I- C10; J- C12.



**Figura 8:** Líquens coletados no Parque Estadual Sítio do Rangedor. A- R01; B-R02; C-R03; D-R04.

## 5. 1. Caracterização morfológica e identificação

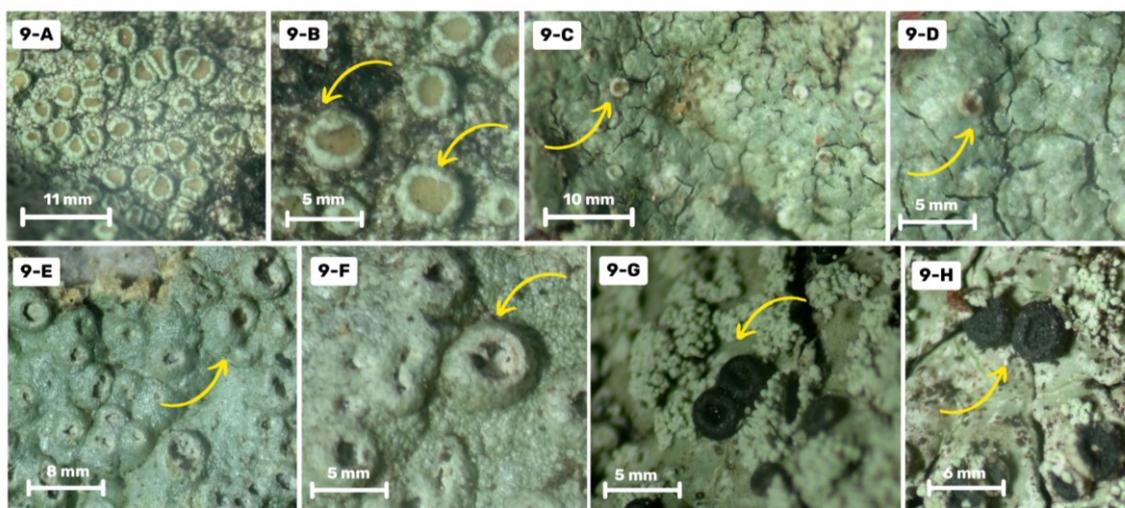
Em laboratório, as amostras foram limpas com água destilada e foram retirados outros fragmentos de natureza orgânica que não correspondem à formação do talo, como estruturas segmentadas de insetos, etc. A identificação morfológica dos espécimes foi realizada com base na observação de características taxonômicas essenciais, incluindo o tipo de talo liquênico, hábito, cor, forma, textura da superfície, além da presença ou ausência de estruturas como sorédios, isídios e ascomas. Essa abordagem permitiu uma análise detalhada e precisa das amostras coletadas.

### 5.1.1. Estruturas reprodutivas

Com o auxílio de uma lupa estereoscópica, foi possível identificar as estruturas relacionadas à reprodução dos fungos liquenizados. Os ascomas, estruturas especializadas, abrigam os ascos, células responsáveis pela formação de esporos sexuados conhecidos como ascósporos (Goodenough & Roth, 2021). Entre as formas de ascomas, destacam-se o apotécio, o peritécio, o cleistotécio e o loculoascoma, cada um com características morfológicas distintas.

O apotécio, em particular, é a forma mais comumente encontrada em líquens (**figura 9**), desempenhando um papel essencial na reprodução e dispersão desses organismos. No talo liquênico, essa estrutura pode variar em sua disposição em relação

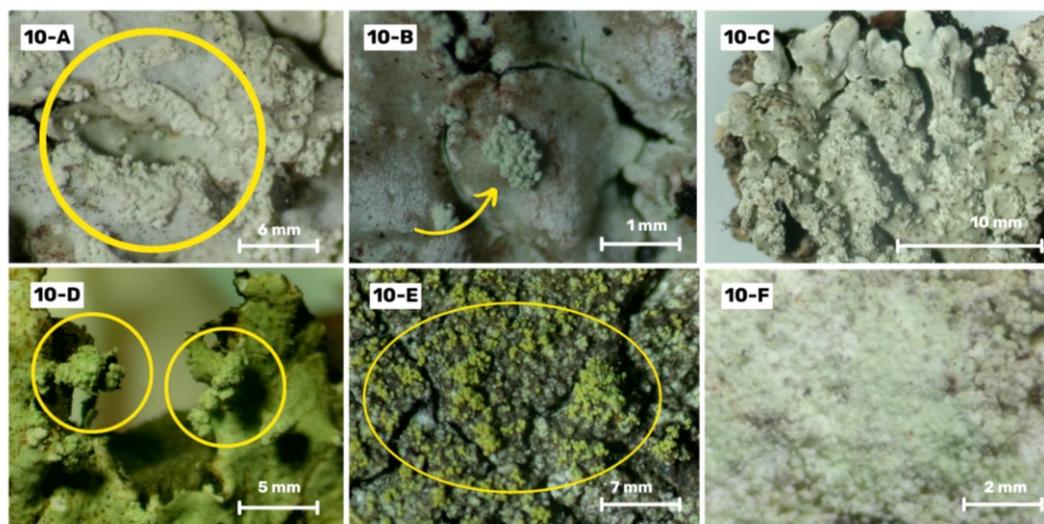
ao substrato, apresentando-se de maneira imersa, superficial ou subepidérmica (R. Honegger, 2012).



**Figura 9:** Apotécios e suas variações observados nos líquens coletados. **9A-6D:** *Lecanora* sp. (SF01-02); **9E-9F:** *Thelotrema* sp. (SF04); **9G-9H:** *Mycoblastus* sp. (C06, 07).

Os isídios são estruturas originadas por projeções do talo líquênico que, ao apresentarem uma superfície de contato ampliada, aumentam a capacidade de capturar novos parceiros fotossintetizantes para a formação da associação líquênica. Já os sorédios, por sua vez, resultam da fragmentação do talo líquênico, sendo constituídos por hifas e células de fotobiontes já presentes no corpo vegetativo. (Moel, 2008). A **Figura 10** ilustra estruturas de sorédios de espécimes coletadas no centro histórico, observadas em lupa estereoscópica.

Líquens localizados em áreas com maior carga de poluentes tendem a priorizar a dispersão por meio de isídios, devido à sua capacidade de colonizar rapidamente locais distantes, bem como o padrão encontrado neste estudo. Por outro lado, a dispersão por sorédios em ambientes poluídos está associada a uma maior absorção de partículas dispersas no ar, o que pode prejudicar o crescimento regular dos líquens nessas condições. (Büdel e Scheidegger, 2008).



**Figura 10:** Estruturas reprodutivas presentes no talo liquênico em amostras coletadas, São Luís/MA. **10.A-10.E:** Isídio; **10-F:** Sorédios; **10.A-10.C:** *Pyxine* sp. (C01,04, 08), **10-D:** *Parmotrema* sp (SF13), **10-E:** *Candelariella* sp. (C02), **10-F:** *Dirinnaria* sp. (R01) . Fonte: Acervo próprio.

A **Tabela 1** apresenta a identificação e caracterização das amostras coletadas, detalhando o local de obtenção e os principais aspectos morfológicos observados, que auxiliam na identificação até os níveis de família e gênero. A maior diversidade de gêneros e características morfológicas de líquens foi encontrada nos pontos de coleta situados na unidade amostral do Sítio do Físico, local associado à baixa taxa de impacto ambiental na área. Em contraste, a ocorrência limitada de gêneros no centro histórico - *Mycoblastus* Norman., 1852 e *Pyxine* Fr., 1825- reflete a ausência de condições ideais para o estabelecimento de outros fungos liquenizados.

**Tabela 1:** Identificação e caracterização morfológica de espécimes coletados.

Família	Gênero	Local de coleta			Hábito de fixação	Morfologia do talo
		SF	CH	SR		
Lecanoraceae Körb.,	<i>Lecanora</i> Ach., 1809.	X			Corticícola	Crostoso
Graphidaceae Dumort.	<i>Thelotrema</i> Ach	X			Corticícola	Crostoso
	<i>Fissurina</i> Fée, 1825	X			Corticícola	Crostoso
Parmeliaceae F. Berchtold & J. Presl	<i>Parmotrema</i> A., massal 1860	X			Corticícola	Folioso
		X				
				X		
Teloschistaceae Zahlbr	<i>Caloplaca</i> Th.Fr., 1860	X			Saxícola	Crostoso

Collemataceae Zenker	<i>Leptogium (Ach.) Gray, 1821</i>	X			Saxícola	Gelatinoso
Caliciaceae Chevall	<i>Pyxine Fr., 1825</i>	X			Corticícola	Folioso
			X		Corticícola	Folioso
			X		Corticícola	Folioso
			X		Corticícola	Folioso
			X		Corticícola	Folioso
			X		Corticícola	Folioso
			X		Corticícola	Folioso
			X		Corticícola	Folioso
				X	Corticícola	Folioso
	<i>Dirinaria (Tuck.) Clem. (1909)</i>			X	Corticícola	Crostoso
	<i>Buelia De Not., 1846</i>			X	Corticícola	Crostoso
Candelariaceae Hakul	<i>Candelariella Müll.Arg., 1894</i>		X		Corticícola	Crostoso
Tephromelataceae Hafellner	<i>Mycoblastus Norman., 1852</i>		X		Corticícola	Crostoso
			X			
Physciaceae	<i>Physcia (Schreb.) Michx., 1803</i>			X	Corticícola	Crostoso

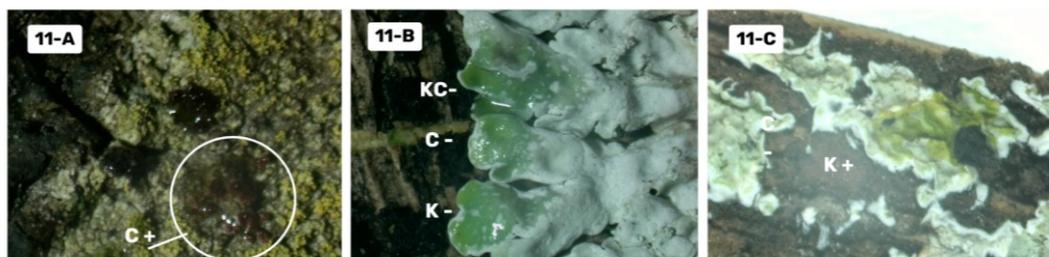
Legenda: SF: Sítio do Físico; CH: Centro Histórico; PR: Parque do Rangedor.

## 5.2. Caracterização química

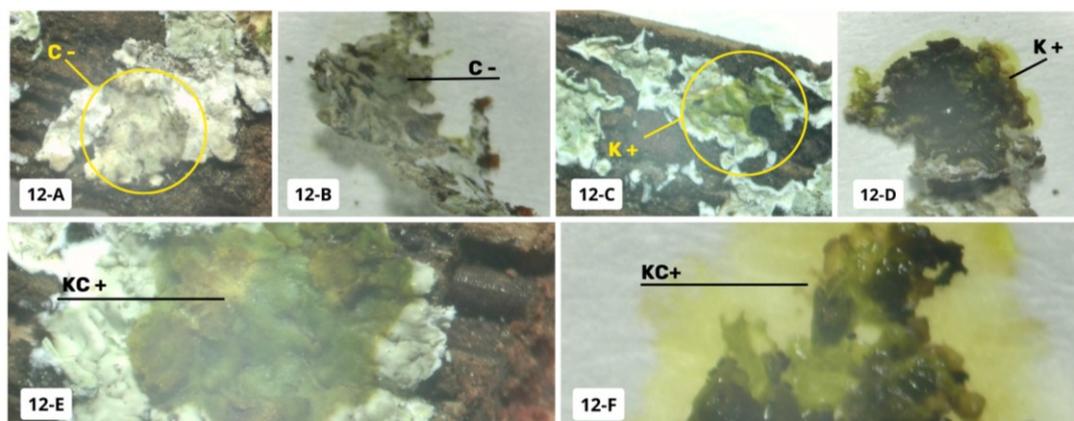
Após a análise das características morfológicas dos espécimes, foram preparadas alíquotas destinadas a diferentes procedimentos analíticos: 1) teste de reação de coloração (KC), 2) cromatografia de camada delgada (CCD) e 3) quantificação de microplásticos. A metodologia completa de caracterização química foi aplicada apenas às amostras que apresentaram biomassa suficiente, seguindo os critérios específicos para os gêneros previamente identificados e compatíveis com cada técnica analítica.

### 5.2.1 Teste de reação de coloração por contato (KC)

Foram aplicados os testes pontuais de utilizando hidróxido de potássio e hipoclorito de cálcio de maneira isolada e em conjunto em porções distintas no fragmento direcionado à etapa. As reações foram observadas em microscópio estereoscópico, bem como exibido nas **Figuras 11-12**.



**Figura 11:** Teste de coloração em amostras coletadas no Centro Histórico e Parque do Rangedor. **11-A:** Reação positiva para C (*Candelariella sp.* -C02); **11-B:** Reação negativa para K, C e KC, (*Pyxine sp.* -C04); **11-C:** Reação positiva para K (*Parmotrema sp.* -R8).



**Figura 12:** Teste de coloração em amostras coletadas no Parque do Rangedor. A: reação negativa para C em amostra R03; B- reação negativa para C em amostra R04; C: reação positiva para K em amostra R03; D: reação positiva para K em amostra R04; E-F reação negativa para KC em amostras R03 e R04, respectivamente.

A maioria das reações realizadas ocorreu em um curto intervalo de tempo, o que impossibilitou a documentação por meio de registros visuais. Os resultados obtidos foram organizados e apresentados na seguinte tabela:

**Tabela 2:** Amostras coletadas com a respectiva classificação do tipo de talo, hábito e resultados dos testes de coloração.

<b>Centro Histórico</b>					
<b>Cód. de amostra</b>	<b>Teste K</b>	<b>Teste C</b>	<b>Teste KC</b>	<b>Teste UV</b>	<b>Ex. de grupos e substâncias líquênicas positivamente expressas para testes de coloração (Orange <i>et al.</i>, 2010)</b>
01	-	-	-	+	
02	+	-	-	-	ácido pulvínico
03	-	-	-	+	
04	-	-	-	+	
05	-	-	-	+	
06	-	-	-	+	
07	-	-	-	+	
08	-	-	-	+	
09	-	-	-	+	
10	-	-	-	+	
<b>Sítio do Físico</b>					
01	-	-	-	-	
02	-	-	-	-	
03	+	-	-	-	Emodina
04	+	-	-	-	ácido dipicolínico
07	+	-	-	-	Eritrina

09	+	-	-	-	
10	+	-	-	-	Atranorina
11	+	-	-	-	Atraquinona (emodina)
12	+	-	-	-	
13	-	-	-	-	Atranorina
<b>Parque do Rangedor</b>					
01	-	-	-	+	
02	-	-	-	+	
03	-	-	-	+	
04	+	-	-	-	Atranorina
05	+	-	-	+	Antraquinona

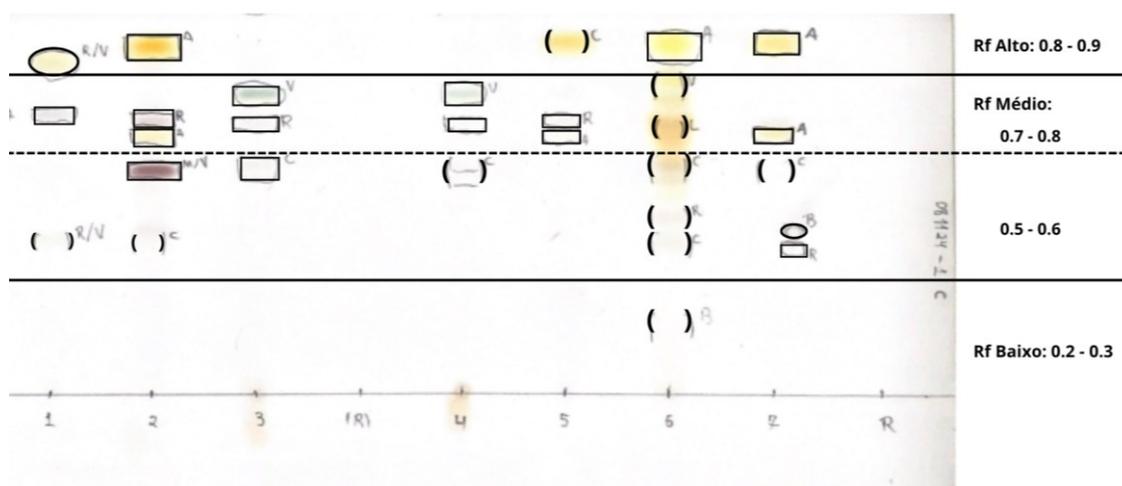
Segundo Jungbluth, P. (2010), a espécie *Pyxine albovirens* (G. Meyer) Aptroot exibe fluorescência amarelada no córtex superior devido a presença de metabólitos secundários como liquexantona, bem como os espécimes classificados entre os gêneros *Pyxine* obtidos na unidade amostral do centro histórico. Algumas espécies agrupadas no gênero *Mycoblastus* apresentam fluorescência verde ou amarelada quando expostas à luz UV, da mesma forma observados nas amostras 06 e 07 coletadas no centro histórico. Apesar de estudos direcionados ao gênero não relatarem diretamente esta reação, a identificação de substâncias como ácido depsídico em espécies deste táxon conferem a característica de fluorescência no córtex superior (Brodo, 2020).

A reação positiva às substâncias comumente utilizadas nos testes químicos de coloração não é observada em todas as espécies de um mesmo gênero, nem resulta na mesma coloração em todas as reações. Segundo Orange e colaboradores (2010), as espécies *Parmotrema perlatum* e *Parmotrema reticulatum* exibem coloração amarela na

porção do córtex superior quando submetidas ao teste com K, o que indica a presença de substâncias do grupo das depsidonas. Embora os espécimes analisados neste estudo tenham mostrado reação positiva ao teste com K, a identificação da espécie não pode depender exclusivamente desse teste de coloração, sendo necessária a aplicação de metodologias de biologia molecular para confirmação precisa.

### 5.2.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A análise do perfil químico dos metabólitos secundários presentes nos líquens coletados foi realizada utilizando a Solução C (tolueno:ácido acético), conforme descrito por Orange, A. et al (2001) Durante o procedimento, foram registradas as colorações e suas variações para identificar os possíveis grupos de compostos. A fixação das manchas na placa permitiu o cálculo manual dos valores de Rf (fator de retenção), utilizando a fórmula:  $Rf = \text{Distância percorrida pela substância (mancha)} / \text{Distância percorrida pelo solvente (frente do solvente)}$ . Os valores obtidos foram posteriormente confirmados com o auxílio do software *Metabolites* (V 1.1.2.0; E. Mietzsch, HT Lumbsch & JA Elix). Para uma melhor caracterização, os compostos foram agrupados por classe com base nos valores de Rf e os resultados foram exemplificados na placa cromatográfica:



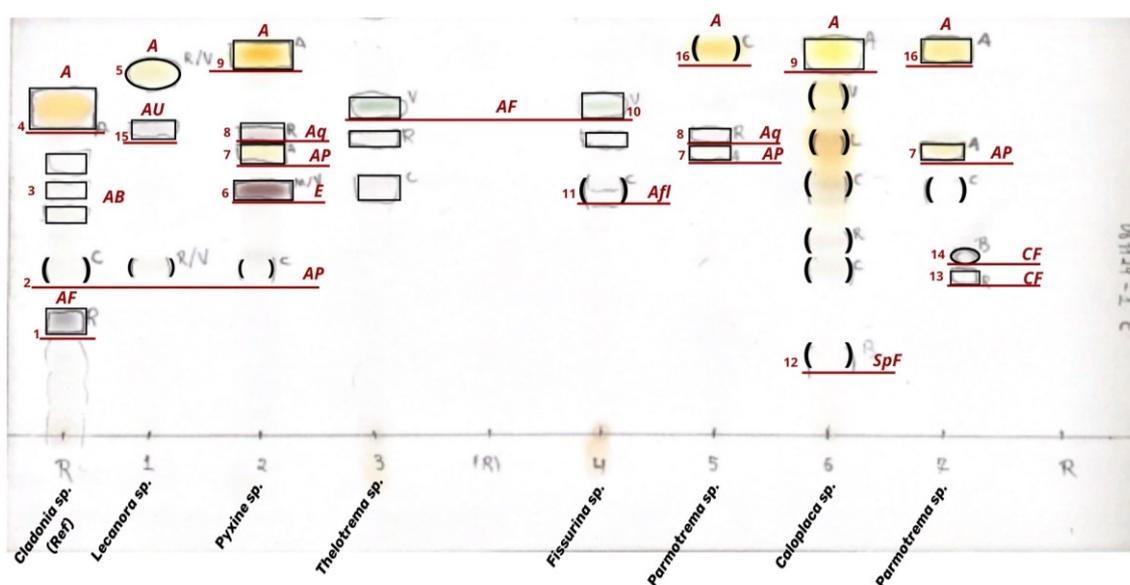
**Figura 13:** Classificação de valores expressos para fator de retenção. **Fonte:** Autora

Foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) um total de 21 amostras, incluindo todas as áreas amostrais, classificadas entre os morfotipos crostoso e folioso. Foram excluídos desta etapa os espécimes que não apresentaram biomassa suficiente, conforme recomendado, além de cianolíquens que, em suma, apresentam

escassez de metabólitos por não serem capazes de produzir derivados fenólicos (Honda & Vilegas, 1999). Os compostos foram identificados com base na literatura destacados nas **tabelas 4-6**, com base em cada amostra identificada e os parâmetros físicos observados (coloração em luzes UV e branca) e, posteriormente, confirmados em software *Metabolites* (V 1.1.2.0; E. Mietzsch, HT Lumbsch & JA Elix) a partir do valor específico de *R<sub>f</sub>*. Para aqueles que demonstraram ambiguidade na predição de subprodutos liquênicos, foi destacado o grupo químico do qual fazem parte.

### 1. Sítio do Físico

A cromatografia de camada delgada (TLC) foi realizada para analisar os compostos metabólicos presentes em 7 amostras de líquens encontrados no Parque Estadual do Bacanga. A **Figura 14** demonstra a placa de TLC que mostra a distribuição e a intensidade dos compostos separados para cada amostra de líquen. A **tabela 4** apresenta os valores de *R<sub>f</sub>* obtidos para os compostos observados a partir da corrida do solvente correspondente a 0.79.



**Figura 14:** Cromatografia de camada delgada direcionada a líquens coletados no Sítio do Físico.

Legenda: Substâncias - A= Atranorina, AU= Ácido úsnico, AB= Ácido Barbático, AP= Ácido Protocetrárico, Ácido Fumarprotocetrárico, Aq= Antraquinona, E= Emodina, Afl= Ácido fenólico, CF= Composto fenólico, SpF= Subproduto fenólico.

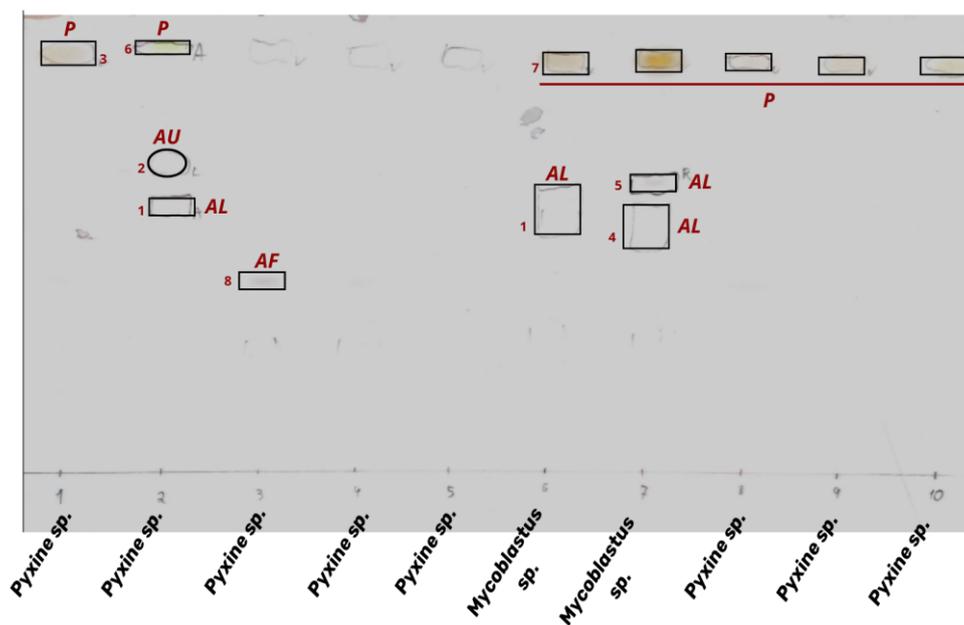
**Tabela 4:** Metabólitos secundários identificados para amostras líquens coletados no Sítio do Físico, São Luís- MA.

Fator de retenção	Cód. da mancha em placa	Substância	Gênero	Referência Bibliográfica
27	1	Ácido Fumarprotocetrárico	<i>Cladonia</i> P.Browne, 1756.	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
40	2	Ácido Protocetrárico	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
66	3	Ácido Barbático:	<i>Cladonia</i> P.Browne, 1756.	Ejiri and Shibata (1975)
71	4	Atranorina	<i>Cladonia</i> P.Browne, 1756.	Ejiri and Shibata (1975)
88	5	Atranorina	<i>Lecanora Ach.</i> , 1809.	Leuckert <i>et al.</i> (1990)
56	6	Emodina	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Harris, R. C. (1995)
64	7	Ácido Protocetrárico	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
69	8	Antraquinona	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
87	9	Atranorina	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
76	10	Ácido Fumarprotocetrárico	<i>Thelotrema Ach.</i>	Lücking, R., <i>et al.</i> (2009)
60	11	Ácido fenólico	<i>Fissurina Fée</i> , 1825.	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
21	12	Subproduto fenólico	<i>Caloplaca</i> <i>Th.Fr.</i> , 1860	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
38	13	Composto Fenólico	<i>Parmotrema A.</i> , <i>massal</i> 1860.	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
42	14	Composto Fenólico	<i>Parmotrema A.</i> , <i>massal</i> 1860.	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
69	15	Ácido úsnico	<i>Lecanora Ach.</i> , 1809.	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
87	16	Atranorina	<i>Parmotrema A.</i> , <i>massal</i> 1860.	Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).

## 2. Centro Histórico

A cromatografia de camada delgada (TLC) foi realizada para identificar os compostos metabólicos presentes em 10 amostras de líquens coletados no centro histórico. A foto da placa de TLC ilustra a distribuição e a intensidade dos compostos

separados em cada amostra (**Figura 15**) e a **tabela 5** seguinte apresenta os valores de Rf correspondentes aos compostos com base corrida do solvente correspondente a 0.93.



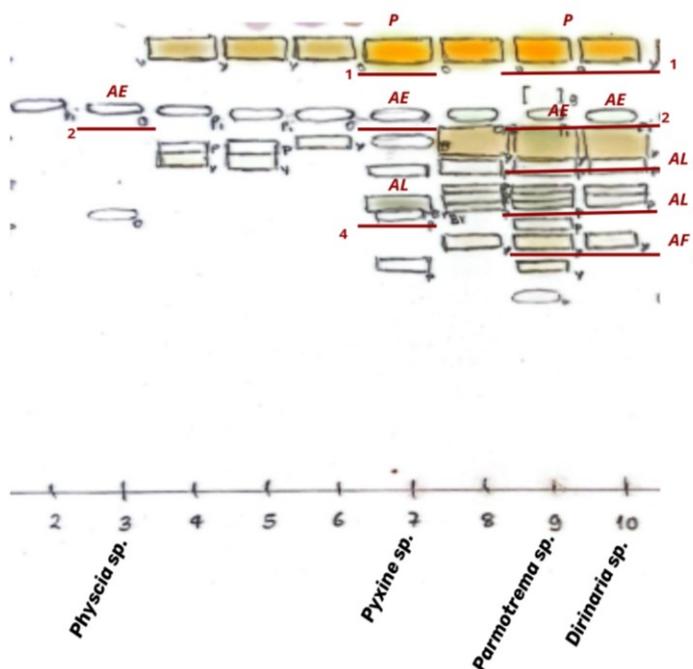
**Figura 15:** Cromatografia de camada delgada direcionada a líquens coletados no Centro Histórico, São Luís- MA. Legenda: P = Parietina, AU= Ácido Úsnico, AL= Ácido Lecanórico, AF= Ácido fumarprotocetrárico.

**Tabela 5:** Metabólitos secundários identificados para amostras líquens coletados em praças localizadas no Centro Histórico, São Luís- MA.

Fator de retenção	Cód. da mancha em placa	Substância	Gênero	Referência Bibliográfica
56	1 D	Ácido Lecanóricco	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Orange, A. <i>et al</i> (2001)
71	2 B	Ácido úsnico	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Orange, A. <i>et al</i> (2001)
95	3 A	Parietina	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Ferreira, R.f. (2018)
59	4 E	Ácido Lecanóricco	<i>Mycoblastus Norman.</i> , 1852	Orange, A. <i>et al</i> (2001)
67	5 F	Ácido Lecanóricco	<i>Mycoblastus Norman.</i> , 1852	Orange, A. <i>et al</i> (2001)
95	6 A	Parietina	<i>Mycoblastus Norman.</i> , 1852	Ferreira, R.f. (2018)
95	7 A	Parietina	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Ferreira, R.f. (2018)
43	8 C	ácido fumarprotocetrárico.	<i>Pyxine</i> Fr., 1825	Orange, A. <i>et al</i> (2001)

### 3. Parque do Rangedor

A cromatografia em camada delgada (TLC) foi realizada para identificar os compostos metabólicos presentes em 4 amostras de líquens coletadas no Parque Estadual Sítio do Rangedor. A imagem da placa de TLC mostra a distribuição e a intensidade dos compostos separados em cada amostra (**Figura 16**). A **tabela 6** apresenta os valores de Rf dos compostos, com base na corrida do solvente, que teve um valor correspondente a 0,73.



**Figura 16:** Cromatografia de camada delgada direcionada a líquens coletados no Parque do Rangedor, São Luís-MA. Legenda: P= Parietina, AE= Ácido esquamático, AL= Ácido Lecanórico, AF= Ácido fenólico.

**Tabela 6:** Metabólitos secundários identificados para amostras líquens coletados no Parque do Rangedor,

Fator de retenção	Cód. da mancha em placa	Substância	Gênero	Referência Bibliográfica
96	1	Parietina	<i>Dirinaria (Tuck.) Clem. (1909)</i>	Lücking, R., <i>et al.</i> (2009); Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
			<i>Pyxine</i> Fr., 1825	
			<i>Parmotrema A., massal 1860</i>	
81	2	Ácido Esquamático	<i>Dirinaria (Tuck.) Clem. (1909)</i>	Lücking, R., <i>et al.</i> (2009); Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
			<i>Pyxine</i> Fr., 1825	
			<i>Parmotrema A., massal 1860</i>	
77	3	Ácido lecanórico	<i>Dirinaria (Tuck.) Clem. (1909)</i>	Lücking, R., <i>et al.</i> (2009); Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
			<i>Pyxine</i> Fr., 1825	
64	4	Ácido lecanórico	<i>Dirinaria (Tuck.) Clem. (1909)</i>	Lücking, R., <i>et al.</i> (2009); Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
			<i>Pyxine</i> Fr., 1825	
58	5	Ácidos fenólicos	<i>Dirinaria (Tuck.) Clem. (1909)</i>	Lücking, R., <i>et al.</i> (2009); Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996).
			<i>Pyxine</i> Fr., 1825	

A cromatografia em camada delgada (TLC) demonstrou ser uma técnica eficiente na separação dos subprodutos líquênicos, permitindo a distribuição dos compostos entre diferentes grupos químicos, como ácidos fenólicos, depsídeos, antraquinonas e xantonas. A análise dos valores do fator de retenção (Rf) entre os compostos revelou variações significativas na polaridade, refletindo as interações entre as fases estacionária e móvel do extrato (Castro & Cédrón, 2013).

A visualização dos compostos parietina e atranorina, pertencentes aos grupos das xantonas e depsídeos, respectivamente, exemplifica claramente a expressão desses compostos ao final da absorção do solvente na placa de CCD, evidenciando padrões de coloração distintos e valores elevados de Rf.

A partir da consistência da metodologia aplicada, foi possível identificar marcadores químicos essenciais para a confirmação de táxons em espécimes líquênicos,

como o ácido lecanórico, que está presente em *Pyxine sp.* e *Mycoblastus sp.* Além disso, a atranorina, um composto comumente utilizado no diagnóstico de líquens, destaca-se por suas funções vantajosas tanto em níveis ecológicos quanto químicos, conferindo-lhe uma vantagem evolutiva (Benatti, M. N., 2014). Neste estudo, a atranorina foi predominantemente detectada em *Parmotrema*, seguida de *Lecanora sp.* e *Pyxine sp.*

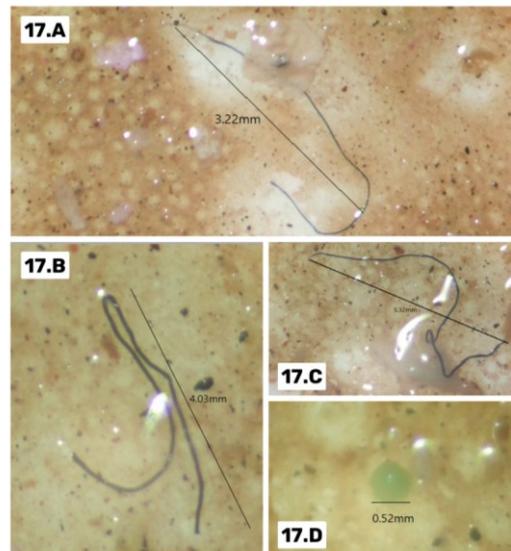
A realização de testes de coloração preliminares antes da identificação dos metabólitos secundários no líquen saxícola *Caloplaca sp.* desempenhou um papel crucial na triagem inicial, indicando a possível presença de compostos fenólicos. A reação positiva ao contato com KOH (K<sup>+</sup> vermelho) foi um indicativo relevante da presença de antraquinonas, direcionando a análise cromatográfica (CCD) para essa classe de substâncias.

A cromatografia confirmou essa identificação com a presença de parietina, um metabólito característico do gênero *Caloplaca*, que exibiu coloração variando entre amarelo e laranja, reforçando sua classificação como antraquinona. Este procedimento demonstrou a eficácia dos testes químicos preliminares na otimização do processo de identificação, o que resultou na redução do tempo de análise e no aumento da precisão dos resultados (Keller NP. *et al.*, 2005).

Os líquens situados no Sítio do Físico, inserido no Parque Estadual do Bacanga, expressaram maior variabilidade de metabólitos secundários, justificado principalmente pela maior viabilidade de gêneros encontrados. De modo contrário, os líquens situados no centro histórico apresentaram menos subprodutos em cromatografia e, no entanto, foi mantido o padrão de compostos entre os mesmos gêneros. A diferença mínima entre os fatores de retenção de compostos e táxons iguais se deve aos níveis distintos de concentração do químico no talo liquênico. A exposição desigual dos fatores de crescimento para os espécimes condiciona a síntese de subprodutos liquênicos de acordo com as necessidades (Ferreira, R.F.2018; Lücking, R., *et al.*, 2009)

### **5.2.3 Análise da acumulação de microplásticos**

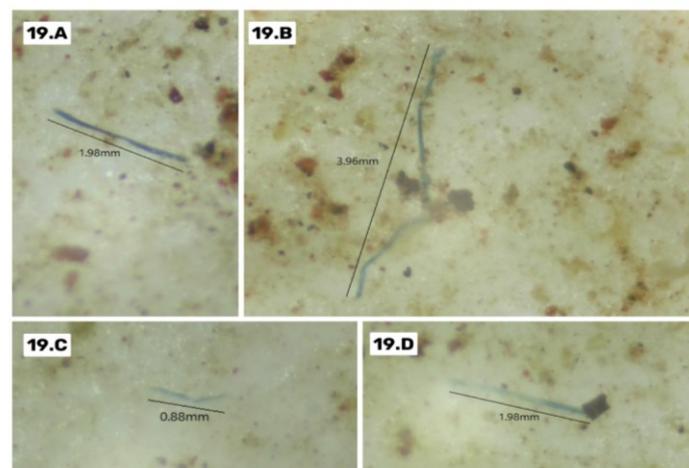
Para determinar o potencial de acumulação de microplásticos no talo liquênicos, foram submetidas ao experimento 1 amostra de cada conjunto amostral, classificados entre os gêneros *Pyxine Fr.*, 1825 (Centro Histórico), *Parmotrema A.*, *massal 1860* (Parque do Rangedor) e *Leptogium (Ach.) Gray*, 1821 (Sítio do Físico). A padronização de protocolo de digestão para os líquens utilizados e a visualização (**Figuras 17-19**) permitiram a caracterização das fibras observadas.



**Figura 17:** Fibras encontradas em digestão de líquen *Parmotrema sp.* coletado no Parque do Rangedor.



**Figura 18:** Fibras encontradas em digestão de líquen *Pyxine sp.* coletado no Centro Histórico.



**Figura 19:** Fibras encontradas em digestão de líquen *Leptogium sp.* coletado no Parque do Rangedor.

Foram observados 11 fragmentos antropogênicos em todos os líquens submetidos à digestão da estrutura. Os resíduos acumulados apareceram em quantidades semelhantes entre as amostras, no entanto, as diferenças notáveis surgiram na taxa de atividade antropogênica e na quantidade de biomassa utilizada para essa etapa do processo. As amostras apresentaram variações na forma e na intensidade da coloração dos resíduos, o que permitiu a sua identificação mais precisa.

A diferenciação dos fragmentos foi facilitada pela análise em lupa estereomicroscópica, que revelou claramente as características distintas dos resíduos, como formato, cor e textura, inferindo sua origem antropogênica. Esses dados indicam que, embora a quantidade de resíduos tenha sido consistente, os fatores ambientais e biológicos podem influenciar na natureza e distribuição dos fragmentos observados.

A densidade relativa de fragmentos sólidos observados nos fragmentos de líquen utilizados foi determinada a partir da aplicação de dados em cálculo →  $Densidade = \text{Numero de partículas de microplástico} / \text{peso seco usado (g)}$  (**Quadro 2**). A partir dos dados obtidos, foi possível perceber que o líquen coletado no Centro (*Pyxine sp.*) apresentou a maior densidade de microplásticos, sugerindo uma maior retenção dessas partículas em seu talo. Já o líquen *Leptogium sp.*, obtido no Sítio do Físico, também demonstrou uma retenção significativa, enquanto o líquen *Parmotrema sp.* coletado no P.Rangedor, apesar de apresentar um número absoluto maior de partículas, exibiu a menor densidade relativa, indicando um acúmulo menor de partículas em suas estruturas.

Esses achados reforçam a hipótese de que fatores estruturais, como morfologia do talo, e características ambientais podem influenciar na capacidade de bioacumulação de microplásticos pelos líquens, destacando sua importância como biomonitores da poluição atmosférica.

**Quadro 2:** Densidade relativa de fragmentos sólidos encontrados em fragmentos de talo líquênico.

Líquén	Peso seco usado (g)	Qtde de partículas de microplástico encontrado	Densidade (partículas/g)
<i>Pyxine sp.</i> (C)	0,05	3	60
<i>Parmotrema sp.</i> (P.R)	1	4	4
<i>Leptogium sp.</i> (S.F)	0,1	4	40

Legenda: C= Centro histórico. P.R= Parque do Rangedor, S.F= Sítio do Físico.

A detecção de poluentes sólidos em estruturas liquênicas, aliada à caracterização do tamanho dos fragmentos, evidencia o risco potencial de contaminação em diversos sistemas, incluindo a ultrapassagem de barreiras biológicas e a acumulação no organismo humano. Microplásticos ultrafinos (menores que 10  $\mu\text{m}$ ) e nanoplásticos (menores que 1  $\mu\text{m}$ ), apresentam maior capacidade de translocação, podendo atingir a corrente sanguínea quando possuem dimensões inferiores a 0,1  $\mu\text{m}$  (100 nm) e alcançar os alvéolos pulmonares quando possuem menos de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, tamanhos estes bem como os encontrados neste estudo. A presença dessas partículas no sistema respiratório pode levar à absorção celular ou desencadear processos inflamatórios, reforçando a necessidade de monitoramento e controle da poluição por microplásticos.

## 6. CONCLUSÃO

A aplicação de metodologias tradicionais de coleta possibilitou a obtenção de 29 líquens, com morfologias diversas, incluindo talos foliosos, crostosos e gelatinosos. O levantamento das características reprodutivas e não reprodutivas do fungo liquenizado orientou a identificação de 12 gêneros, distribuídos em 9 famílias. Os pontos de coleta estabelecidos refletiram significativamente a diversidade de táxons, com variações notáveis relacionadas ao nível de qualidade ambiental observado.

A realização de testes de reação de coloração desempenhou um papel importante na caracterização preliminar dos compostos químicos presentes, além de corroborar a identificação morfológica realizada. A cromatografia em camada delgada (CCD) demonstrou uma separação eficiente dos componentes da amostra, com manchas bem definidas e valores de fator de retenção ( $R_f$ ) distintos. Houve uma concordância entre os compostos identificados nos espécimes anteriormente classificados no mesmo táxon, além da identificação de compostos frequentemente expressos.

A presença de fragmentos plásticos nas amostras analisadas destaca o potencial de bioacumulação de microplásticos no talo liquênico, evidenciando a utilidade dos líquens como bioindicadores e ferramentas eficazes para o biomonitoramento ambiental. Este estudo não apenas contribui para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade local, com novos registros para os gêneros *Leptogium*, *Fissurina*, *Dirinaria*, *Caloplaca*, *Thelotrema*, *Candelariella* e *Mycoblastus*, mas também reforça a importância de uma abordagem metodológica multifacetada, que enriquece a caracterização dos líquens, integrando informações morfológicas e químicas.

## 7. REFERÊNCIAS

- AMORIM, F. A. C. *et al.* Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v. 31, 2008.
- BASALIAH, T.; SUSHMA, N. R.; NAVEENKUMAR, K. J. Antimicrobial property of bioactive factor isolated from *Parmelia perlata*. **Int Multidisc Res J**, v. 2, p. 1–5, 1 jan. 2012.
- BENATTI, M. N. Espécies de *Parmotrema* (Parmeliaceae, Ascomycota) no Parque Estadual da Cantareira, Estado de São Paulo, Brasil, II: as espécies emaculadas ou com máculas irregulares. **Hoehnea**, v. 41, 2014.
- BLANCO, O. *et al.* Molecular Phylogeny of Parmotremoid Lichens (Ascomycota, Parmeliaceae). **Mycologia**, v. 97, p. 150–159, 1 jan. 2005.
- BRODO, I. M. *et al.* **Lichens of North America**. [s.l.] Yale University Press, 2001.
- BRODO, I. Microchemical Methods for the Identification of Lichens. **Bryologist**, v. 106, p. 345–345, 1 jun. 2003.
- BRODO, I. **Keys to Lichens of North America: Revised and Expanded**. [s.l.: s.n.].
- BÜDEL, B.; SCHEIDEGGER, C. Thallus morphology and anatomy. Em: **Lichen Biology**. [s.l.: s.n.]. p. 40–68.
- BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, 2003.
- CASTRO, O.; CEDRÓN, J. Metabolitos secundarios del liquen *Hypotrachyna chicitae*. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 79, p. 144–149, 1 abr. 2013.
- CHENG, S.-C.; HUANG, M.-Z.; SHIEA, J. Thin layer chromatography/mass spectrometry. **Planar Chromatography**, v. 1218, n. 19, p. 2700–2711, 13 maio 2011.
- COCCARO, D. M. B.; SAIKI, M. **Estudo da determinação de elementos-traço em líquens para monitoração ambiental**. Master's Thesis—[s.l.] Universidade de São Paulo, 2001.
- CUNHA, I. P. R.; MARCELLI, M. P.; PEREIRA, E. C. Espécies de *Canoparmelia* s.l. (Parmeliaceae, ascomycetes liquenizados) da região tocantina, MA e TO, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, 2015.

DE LEMOS, A. B.; KAFFER, M. I.; MARTINS, S. M. A. Composição e diversidade de líquens corticícolos em três diferentes ambientes: Florestal, Urbano e Industrial. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 228-230, 16 nov. 2007.

DÖRING, H.; LUMBSCH, H. T. Ascoma Ontogeny: is this Character Set of any Use in the Systematics of Lichenized Ascomycetes? **The Lichenologist**, v. 30, n. 4–5, p. 489–500, 1998.

EJIRI, H.; SANKAWA, U.; SHIBATA, S. Graciliformin and its acetates in *Cladonia graciliformis*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 1, p. 277–279, 1 jan. 1975.

FRIEDL, T.; BÜDEL, B. Photobionts. Em: NASH, T. H. E., III (Ed.). **Lichen Biology**. [s.l.] Cambridge University Press, 2008. p. 9–26.

FRITIS, M. C. *et al.* Depsides and triterpenes in *Pseudocyphellaria coriifolia* (lichens) and biological activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 17, p. 1607–1610, 1 set. 2013.

GOODENOUGH, U.; ROTH, R. Lichen 2. Constituents. **Algal Research**, v. 58, p. 102356, 1 out. 2021.

GRUBE, M.; LINDBLOM, L.; MAYRHOFER, H. Contributions to the lichen flora of Crete: a compilation of references and some new records. 2001.

GRUBE, M.; WEDIN, M. Lichenized Fungi and the Evolution of Symbiotic Organization. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 6, dez. 2016.

HALE, M. E. **The Biology of Lichens**. [s.l.] Edward Arnold, 1983.

HAWKSWORTH, D. L.; GRUBE, M. Lichens redefined as complex ecosystems. **The New phytologist**, v. 227, n. 5, p. 1281–1283, set. 2020.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, jul. 2017.

HIROSE, Y. *et al.* Genome sequencing of the NIES Cyanobacteria collection with a focus on the heterocyst-forming clade. **DNA Research**, v. 28, n. 6, p. dsab024, 1 dez. 2021.

HODKINSON, B.; UEHLING, J.; SMITH, M. *Lepidostroma vilgalysii*, a new basidiolichen from the New World. **Mycological Progress**, v. 11, p. 827–833, 25 nov. 2011.

HOEK, C. VAN DEN; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press Cambridge, 1995.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v. 22, 1999.

HONEGGER, R. 15 The Symbiotic Phenotype of Lichen-Forming Ascomycetes and Their Endo- and Epibionts. Em: HOCK, B. (Ed.). **Fungal Associations**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 287–339.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. Identification of Lichen Substances. Em: HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. (Eds.). **Identification of Lichen Substances**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996. p. 11–123.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. Identification of Lichen Substances. Em: HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. (Eds.). **Identification of Lichen Substances**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996. p. 11–123.

KAASALAINEN, U. *et al.* Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 15, p. 5886–5891, 10 abr. 2012.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937–947, dez. 2005.

KOMAREK, J. *et al.* Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia -Praha-**, v. 86, p. 295–335, 1 dez. 2014.

KUNG, S. D.; MOSCARELLO, M. A.; WILLIAMS, J. P. Studies with Deoxyribonucleic Acid from Blue-Green Algae. **Plant Physiology**, v. 49, n. 3, p. 331–334, 1 mar. 1972.

LANDRIGAN, P. J. *et al.* The Lancet Commission on pollution and health. **The Lancet**, v. 391, n. 10119, p. 462–512, 3 fev. 2018.

LATKOWSKA, E. *et al.* Secondary metabolites of the lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. and their presence in spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) bark. **Phytochemistry**, v. 118, p. 116–123, out. 2015.

LAWREY, J.; DIEDERICH, P. Lichenicolous Fungi: Interactions, Evolution, and Biodiversity. **Bryologist**, v. 106, p. 80–120, 1 mar. 2003.

LE POGAM, P.; HERBETTE, G.; BOUSTIE, J. Analysis of Lichen Metabolites, a Variety of Approaches. Em: UPRETI, D. K. *et al.* (Eds.). **Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Biomonitoring and Bioprospection, Volume 1**. New Delhi: Springer India, 2015. p. 229–261.

LEAVITT, S.; LUMBSCH, T. Ecological Biogeography of Lichen-Forming Fungi. Em: [s.l: s.n.]. p. 15–37.

LÜCKING, R.; LEAVITT, S. D.; HAWKSWORTH, D. L. Species in lichen-forming fungi: balancing between conceptual and practical considerations, and between phenotype and phylogenomics. **Fungal Diversity**, v. 109, n. 1, p. 99–154, 1 jul. 2021.

LÜCKING, R. *et al.* How many tropical lichens are there really? **Bibliotheca Lichenologica**, v. 100, p. 399–418, 1 jan. 2009.

LUCKNER, P. D. M. **Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals**. Springer Berlin Heidelberg. **Anais...**1984. Disponível em: <<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:38810786>>

MAKI, E. *et al.* Utilização de Bioindicadores em Monitoramento de Poluição. **Biota Amazônia**, v. 3, p. 169–178, 30 ago. 2013.

MARTINS, S. M. DE A.; KÄFFER, M. I.; LEMOS, A. Liqueus como bioindicadores da qualidade do ar numa área de termoeletrica, Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, 2008.

MASURA, J. *et al.* Laboratory methods for the analysis of microplastics in the marine environment: recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments. NOAA technical memorandum NOS-OR&R ; 48. 2015.

MENDES, C. R.; *Dissertação de Mestrado*. Escola Paulista de Medicina, 1994, São Paulo.

MIRANDA-GONZÁLEZ, R.; MCCUNE, B.; MOLDENKE, A. R. Lichens as material for Lepidoptera's housing: A molecular approach to a widespread and highly selective interaction. **Fungal Ecology**, v. 61, p. 101195, 1 fev. 2023.

MOEL, R. S. P. Liqueus. Ed. Vertigem. 27 p. Portugal: 2008.

NASH, I., Thomas H. (ED.). **Lichen Biology**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

NELSEN, M. P. *et al.* The macroevolutionary dynamics of symbiotic and phenotypic diversification in lichens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 35, p. 21495–21503, 2020.

NIMIS, P.; SCHEIDEGGER, C.; WOLSELEY, P. **Monitoring with Lichens—Monitoring Lichens**. [s.l: s.n.]. v. 105

OLIVEIRA, S. R. Avaliação da espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução no desenvolvimento de métodos analíticos para diagnóstico foliar de cana-de-açúcar e laranjeira. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, 2010.

OLIVEIRA C. V. Levantamento preliminar de líquens epifíticos comumente utilizados como bioindicadores da qualidade do ar na estação ecológica da UFMG, Brasil: gêneros parmotrema e canoparmelia. Universidade Federal de Minas Gerais/ Departamento de Microbiologia. 2008.

OSYCZKA, P.; CHOWANIEC, K.; SKUBAŁA, K. Membrane lipid peroxidation in lichens determined by the TBARS assay as a suitable biomarker for the prediction of elevated level of potentially toxic trace elements in soil. **Ecological Indicators**, v. 146, p. 109910, 1 fev. 2023.

P, M. The Biology of the Algae By F. E. Round Edward Arnold (Publishers) Ltd. Pp. vii + 269, 8 pls., 69 text-figures. 36s. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 45, n. 3, p. 799–799, 1965.

RAI, A. N.; BERGMAN, B.; RASMUSSEN, U. **Cyanobacteria in Symbiosis**. Springer Netherlands. **Anais...**2002. Disponível em: <<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:5074495>>

RIKKINEN, J.; OKSANEN, I.; LOHTANDER, K. Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5580, p. 357, 19 jul. 2002.

SAHOO, D.; SECKBACH, J. **The Algae World**. [s.l: s.n.].

SAIKI, M. *et al.* Biomonitoring of the atmospheric pollution using lichens in the metropolitan area of São Paulo city, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 271, n. 1, p. 213–219, 1 jan. 2007.

SANCHO, L. G.; PINTADO, A. I. Evidence of high annual growth rate for lichens in the maritime Antarctic. **Polar Biology**, v. 27, p. 312–319, 2004.

SANDERS, W. B. Lichens: The Interface between Mycology and Plant Morphology: Whereas most other fungi live as an absorptive mycelium inside their food substrate, the lichen fungi construct a plant-like body within which photosynthetic algal symbionts are cultivated. **BioScience**, v. 51, n. 12, p. 1025–1035, 1 dez. 2001.

SANTIAGO, I. F. Diversidade e bioprospecção de fungos associados a líquens presentes em ecossistemas extremos. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. 2016.

SANTOS, J. *et al.* OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES CORTICÍCOLAS DE Parmotrema A.MASSAL. (PARMELIACEAE; ASCOMYCOTA LIQUENIZADOS) EM VEGETAÇÃO DE CERRADO NO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL. Occurrence of corticicles species of Parmotrema A.Massal. (Parmeliaceae; Ascomycota lichenized) in Cerrado vegetation in the state of Maranhão, Brazil. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 15, p. 1–15, 2 maio 2021.

SANTOS, R. K. DOS *et al.* Lichens used as bioindicator of air quality in mining town of Itabira. **Research, Society and Development**, v. 7, n. 12, p. e4712480, 23 ago. 2018.

SATURNINO, S. F. GRADIENTE ALTITUDINAL DE MERCÚRIO EM LÍQUEN POR DEPOSIÇÃO ATMOSFÉRICA NA SERRA CATARINENSE. [s.l.] Universidade do Estado de Santa Catarina, 2021.

SCHEIDEGGER, C.; SPERISEN, C.; ZOLLER, S. Pcr Primers for the Amplification of Mitochondrial Small Subunit Ribosomal DNA of Lichen-forming Ascomycetes. **The Lichenologist**, v. 31, n. 5, p. 511–516, 1999.

SCHMID, R. **Taxon**, v. 50, n. 4, p. 1290–1290, 2001.

SCHOCH, C. L. *et al.* The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. **Systematic biology**, v. 58, n. 2, p. 224–239, abr. 2009.

SILVA, I. *et al.* ANÁLISE DE ESPÉCIES DE FUNGOS LIQUENIZADOS DO GÊNERO PARMOTREMA COMO BIOMONITORES DE POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA EM TRECHOS URBANOS DA CIDADE DE IMPERATRIZ – MA. [s.l: s.n.].

SILVA, R. F. DA *et al.* INTERAÇÃO DO LÍQUEN *Cladonia verticillaris* COM SOLO DE SUA ÁREA DE OCORRÊNCIA. **Caminhos de Geografia**, v. 13, n. 42, p. 50–58, 15 jun. 2012.

SIVONEN, K. *The Encyclopedia of Microbiology*, ed Schaechter M (Academic, Oxford). 2009.

SPRIBILLE, T. *et al.* Evolutionary biology of lichen symbioses. **New Phytologist**, v. 234, n. 5, p. 1566–1582, 2022.

TAUROZZI, D. *et al.* Passive biomonitoring of airborne microplastics using lichens: A comparison between urban, natural and protected environments. **Environment international**, v. 187, p. 108707, maio 2024.

THELL, Arne *et al.* A review of the lichen family Parmeliaceae—history, phylogeny and current taxonomy. **Nordic Journal of Botany**, v. 30, n. 6, p. 641–664, 2012.

THOMSON, J. W. **The Lichen Genus *Cladonia* in North America**. [s.l.] University of Toronto Press, 1967.

TSCHERMAK-WOESS, E. New and known taxa of *Chlorella* (Chlorophyceae): occurrence as lichen phycobionts and observations on living dictyosomes. **Plant Systematics and Evolution**, v. 159, n. 1/2, p. 123–139, 1988.

UPRETI, D. *et al.* **Recent Advances in Lichenology Volume 2: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques**. [s.l.: s.n.].

VILLAROUCO, F. *et al.* Análisis del líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., en condiciones de laboratorio bajo efecto del estireno y ciclohexano. **Interciencia**, v. 32, p. 242–246, 1 abr. 2007.

VITIKAINEN, O. William Nylander (1822–1899) and Lichen Chemotaxonomy. **The Bryologist**, v. 104, n. 2, p. 263–267, 2001.

VORMITTAG, E. DA M. P. A. DE A. *et al.* Análise do monitoramento da qualidade do ar no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 35, 2021.

VU, T. H. *et al.* Depsides: Lichen Metabolites Active against Hepatitis C Virus. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120405, 20 mar. 2015.

WANG, L. *et al.* The Chloroplast Genome of the Lichen Photobiont *Trebouxioiophyceae* sp. DW1 and Its Phylogenetic Implications. **Genes**, v. 13, n. 10, 2022.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

WHITE, F. J.; JAMES, P. W. **A New Guide to Microchemical Techniques for the Identification of Lichen Substances**. [s.l.] British Lichen Soc., 1985.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Lichen Substances and Their Biological Activities. **Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques, Volume 2**, p. 181–200, 10 fev. 2015.

YANG, X. *et al.* Nostoclide I and II, extracellular metabolites from a symbiotic cyanobacterium, *Nostoc* sp., from the lichen *Peltigera canina*. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 5, p. 761–764, 29 jan. 1993.

YOUSUF, S.; CHOUDHARY, M. I.; ATTA-UR-RAHMAN. Chapter 7 - Lichens: Chemistry and Biological Activities. Em: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 43p. 223–259.

Air Pollution and Health - A Science-Policy Initiative. **Annals of global health**, v. 85, n. 1, p. 140, 16 dez. 2019.