



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
ENERGÉTICAS E NUCLEARES

RICARDO LUIZ CALAZANS DE LUNA FILHO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO SOBRE *DROSOPHILA*
MELANOGASTER EM ÁGUAS DE POÇOS EM MUNICÍPIOS DE PERNAMBUCO E
PARAÍBA INFLUENCIADOS POR OCORRÊNCIAS DE URÂNIO NATURAL**

Recife

2020

RICARDO LUIZ CALAZANS DE LUNA FILHO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO SOBRE *DROSOPHILA*
MELANOGASTER EM ÁGUAS DE POÇOS EM MUNICÍPIOS DE PERNAMBUCO E
PARAÍBA INFLUENCIADOS POR OCORRÊNCIAS DE URÂNIO NATURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. José Araújo dos Santos Júnior.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.

Recife
2020

- L961m Luna Filho, Ricardo Luiz Calazans de.
Investigação do efeito genotóxico sobre *Drosophila Melanogaster* em águas de poços em municípios de Pernambuco e Paraíba influenciados por ocorrências de urânio natural / Ricardo Luiz Calazans de Luna Filho - 2020.
91 folhas, il., gráfs., tabs.
- Orientador: Prof. Dr. José Araújo dos Santos Júnior.
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2020.
Inclui Referências.
1. Energia Nuclear. 2. *Drosophila melanogaster*. 3. Ensaio cometa. 4. Genotoxicidade. 5. Radioproteção. 6. Radioecologia. I. Santos Júnior, José Araújo dos (Orientador). II. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque (Coorientadora). III. Título

UFPE

612.01448 CDD (22. ed.)

BCTG/2021-28

RICARDO LUIZ CALAZANS DE LUNA FILHO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO SOBRE *DROSOPHILA*
MELANOGASTER EM ÁGUAS DE POÇOS EM MUNICÍPIOS DE PERNAMBUCO E
PARAÍBA INFLUENCIADOS POR OCORRÊNCIAS DE URÂNIO NATURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 07/08/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Araújo dos Santos Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Alberto Antônio da Silva (Examinador Externo)
Instituto Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Williams Nascimento de Siqueira (Examinador Externo)
Centro Regional de Ciências Nucleares

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e força nessa longa caminhada fazendo-me superar todas as dificuldades.

Ao PROTEN pela oportunidade para desenvolvimento desta Dissertação de Mestrado.

A capes, pelo apoio financeiro

A toda equipe do SEAMB do CRCN-NE e do Laboratório de Genética do CAV-UFPE pelo suporte as pesquisas.

Ao grupo RAE, pelo suporte, pelos momentos de dúvidas, de risadas e de vários almoços ao longo dessa caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Araújo, pela confiança, orientação, por ter me recebido e apoiado no mestrado.

A minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Ana Melo por ser uma mãe. Agradecer pela confiança, orientação, apoio.

Aos meus pais, Ricardo e Marily, que não só neste momento, mas em toda a minha vida me apoiaram, me compreenderam e me estimularam a continuar nessa caminhada.

A Larissa, o amor da minha vida, que me deu e ainda dá amor, carinho, companheirismo e sem perceber, foi a pessoa que mais me incentivou e que aguentou minhas reclamações, apereios e estresses.

Ao meu tio Dinho e tia Mariomar por sempre me apoiarem e incentivarem.

Aos meus irmãos Rafael e Mellina por sempre torcerem por mim.

A todos do laboratório de Radiobiologia pelo carinho, respeito e apoio pra continuar nessa caminhada, além das conversas, risadas, principalmente Vinícius, porque sem ele não somos faísca e fumaça e nem dupla sertaneja.

Ao Departamento de Biofísica e Radiobiologia por todo o suporte.

Aos meus amigos de infância Lennon e Júlio pelos vários momentos que passamos juntos, mesmo um pouco distante, torceram e contribuíram nessa jornada.

E a todos que contribuíram, só tenho a agradecer.

RESUMO

O avanço tecnológico propiciou o uso da água subterrânea, liberando as atividades humanas do uso exclusivo dos mananciais de superfície. No entanto, a composição química das rochas que alojam os mananciais subterrâneos pode ser favorável ou desfavorável à saúde de uma forma geral. A ocorrência de minerais radioativos nestes locais pode comprometer a qualidade da água, pois podem causar efeitos imediatos ou tardios aos sistemas biológicos após sua ingestão. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os danos genotóxicos ocasionados por águas obtidas de poços artesianos nas áreas de fosforito uranífero no município de Abreu e Lima (PE) e de ocorrência NORM na Paraíba, município de São José do Sabugi; além de estimar as concentrações de ^{222}Rn , ^{226}Ra ; ^{238}U , ^{232}Th , ^{207}Pb , ^{112}Cd , ^{122}Sb e ^{95}Mo presentes nessas águas. Para a quantificação do ^{222}Rn e ^{226}Ra foi utilizado o Espectrômetro de Cintilação Líquida (LSC). A determinação das concentrações de urânio, tório, chumbo, cádmio e antimônio foi realizada utilizando Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). O dano genotóxico foi avaliado utilizando o modelo experimental *Drosophila melanogaster* frente as amostras de água coletadas em poços nos municípios estudados e analisadas por meio do ensaio cometa. Água destilada foi utilizada como controle negativo e a ciclofosfamida, como controle positivo. O bioensaio foi realizado em triplicata, sendo observado 100 nucleóides por amostra, permitindo quantificar a incidência de danos ao DNA por meio da análise da frequência e índice de danos, classificados de acordo com a extensão da cauda do cometa. Os resultados identificados na análise radiométrica apresentaram níveis elevados de ^{222}Rn em todas as amostras de água de poços com valores acima do limite máximo permitido para consumo humano (11,1 Bq L elevado a -1), segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - USEPA. Na análise da concentração de metais pesados foram detectados valores de urânio acima do limite máximo permitido para consumo humano nas amostras de água de poços do município de São José do Sabugi-PB, segundo a Portaria de Consolidação nº5/17, do Ministério da Saúde (30 µg.L elevado a -1). Foram observados danos genotóxicos em larvas de *Drosophila melanogaster* exposta a águas de poços dos municípios de São José do Sabugi e Abreu e Lima. Observou-se relação dose-dependente das amostras de água de poços do município de São José do Sabugi-PB com a concentração de urânio, sugerindo que os efeitos genotóxicos nos hemócitos de larvas de *D. melanogaster* podem estar relacionados com a presença desse elemento. O ensaio cometa em *D. melanogaster* mostrou-se sensível na detecção de danos

provocados pelas amostras de água dos poços estudados. Portanto, este modelo biológico pode ser utilizado na análise da qualidade de água de poços presentes em regiões de fosforito urinífero e em locais de presença NORM.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*. Ensaio cometa. Genotoxicidade. Radioproteção. Radioecologia.

ABSTRACT

Technological advancement led to the search for groundwater, releasing human activities from the exclusive use of surface springs. However, the chemical composition of the rocks that house the underground springs may be favorable or unfavorable to health in general. The occurrence of radioactive minerals in these places can compromise water quality, as it can cause immediate or delayed effects on biological systems after ingestion. Therefore, the purpose of this work was to evaluate the genotoxic damages caused by waters obtained from artesian wells in the areas with uraniferous phosphite in the municipalities of Abreu e Lima (PE) and the NORM occurrence in São José do Sabugi, Paraíba. Besides estimating the concentrations of ^{222}Rn , ^{226}Ra , ^{238}U , ^{232}Th , ^{207}Pb , ^{112}Cd , ^{122}Sb and ^{95}Mo present in these waters. For the environment monitoring the Liquid Scintillation Spectrometer (LSC) was used to quantify the ^{222}Rn and ^{226}Ra . To determine the concentrations of Uranium, Thorium, Lead, Cadmium and Antimony was used Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS). Genotoxic damage was evaluated using the experimental model of *Drosophila melanogaster* larvae against water samples collected from wells in the municipalities mentioned and analysed by the Comet Assay. Distilled water was used as negative control and cyclophosphamide as positive control. The assays were performed in triplicate, with 100 nucleoids per sample being observed, allowing to quantify the incidence of DNA damage by analyzing the frequency and damage index, classified according to the length of the comet's tail. The results identified in the radiometric analysis showed high levels of ^{222}Rn in all water samples from wells with values above the maximum limit allowed for human consumption (11.1 Bq L raised to -1), according to the United States Environmental Protection Agency – USEPA. In the analysis of the concentration of heavy metals, uranium values above the maximum permitted limit for human consumption were detected in water samples from wells in the municipality of São José do Sabugi-PB, according to Consolidation Ordinance No. 5/17, of the Ministry of Health (30 μg . L raised to -1). Genotoxic damage was observed in *Drosophila melanogaster* larvae exposed to well water in the municipalities of São José do Sabugi and Abreu e Lima. A dose-dependent relationship was observed between water samples from wells in the municipality of São José do Sabugi-PB with uranium concentration, suggesting that the genotoxic effects in the hemocytes of *D. melanogaster* larvae may be related to the presence of this element. The comet assay in *D. melanogaster* proved to be sensitive in detecting damage caused by water samples from the studied wells.

Therefore, this biological model can be useful in analyzing the water quality of wells present in urine phosphorite regions and in places of NORM presence.

Keywords: *Drosophila melanogaster*. Comet assay. Genotoxicity. Trace elements. Radioprotection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Dose individual média anual decorrente de fontes naturais.....	18
Quadro 1 – Série de decaimento do ^{238}U	21
Quadro 2 – Série de decaimento do ^{232}Th	23
Figura 2 – Localização da Bacia Sedimentar da Paraíba.....	27
Figura 3 – Esquema do Espectrômetro de Massas tipo ICP-MS.....	32
Figura 4 – Interface focalizadora de íons	33
Figura 5 – Analisador de massas quadripolar.....	33
Figura 6 – Espectrômetro de Cintilação Líquida, Quantulus 1220, da Perkin Elmer.	34
Figura 7 – Conversões de energia ocorridas no Espectrômetro de Cintilação Líquida.....	35
Figura 8 – <i>Drosophila melanogaster</i>	37
Figura 9 – Estágios de desenvolvimento da <i>Drosophila melanogaster</i>	38
Figura 10 – Área de estudo de Pernambuco e Paraíba	43
Figura 11 – Esquema do ensaio cometa em <i>D. melanogaster</i>	52
Figura 12 – Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético	53
Figura 13 – Fluxograma das etapas realizadas na pesquisa.....	54
Figura 14 – Índice e frequência de danos observados em hemócitos de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> Oregon-R expostas às amostras de água de poços de São José do Sabugi-PB.....	64
Figura 15 – Índice e frequência de danos observados em hemócitos de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> Oregon-R expostas às amostras de água de poços de Abreu e Lima-PE.....	65
Figura 16 – Dendrograma de agrupamentos de dados a partir da técnica de Clustering em amostras de água de poços no município de São José do Sabugi-PB	66
Figura 17 – Dendrograma de agrupamentos de dados a partir da técnica de Clustering em amostras de água de poços no município de Abreu e Lima-PE	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isótopos naturais do radônio e suas propriedades	25
Tabela 2 – Padrões de potabilidade.	29
Tabela 3 – Valor máximo permitido das concentrações de metais pesados	30
Tabela 4 – Coordenadas dos pontos de coleta	45
Tabela 5 – Controle da qualidade do procedimento analítico para a determinação de ^{222}Rn e ^{226}Ra em água.....	55
Tabela 6 – Valores de referência do controle da qualidade do procedimento analítico de metais em água.	56
Tabela 7 – Parâmetros físico-químicos encontrados	57
Tabela 8 – Concentrações específicas médias de ^{222}Rn e ^{226}Ra nas águas de poços dos estados de Pernambuco e Paraíba	58
Tabela 9 – Concentrações médias de metais pesados nas águas de poços em áreas de Pernambuco e Paraíba.....	59
Tabela 10 – Danos genéticos em hemócitos de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> Oregon- R.	62

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Eficiência da contagem	47
Equação 2 – Concentração de atividade do ^{222}Rn	47
Equação 3 – Concentração de atividade do ^{226}Ra	47
Equação 4 – Qualidade do procedimento analítico (Número En)	48
Equação 5 – Qualidade do procedimento analítico (Z-Score)	49
Equação 6 – Índice de dano	53
Equação 7 – Frequência de dano	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	RADIOECOLOGIA E RADIOATIVIDADE AMBIENTAL.....	18
2.1.1	Radionuclídeos investigados	20
2.1.1.1	Urânio	20
2.1.1.2	Tório	22
2.1.1.3	Rádio.....	24
2.1.1.4	Radônio.....	25
2.2	FOSFORITO URANÍFERO E ÁGUAS SUBTERRÂNEAS	26
2.3	METAIS PESADOS.....	29
2.4	TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS	31
2.4.1	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)	31
2.4.2	Espectrômetro de Cintilação Líquida	34
2.4.3	Bioindicadores: Avaliação do impacto ambiental em recursos hídricos.....	35
2.4.3.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	37
2.5	ENSAIO COMETA	41
3	METODOLOGIA	43
3.1	ÁREAS DE ESTUDO	43
3.2	COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	45
3.3	DETERMINAÇÃO DO ²²² RN E ²²⁶ RA	46
3.4	ANÁLISE DOS METAIS TRAÇOS.....	48
3.4.1	Análise dos Resultados	49
3.4.1.1	Incerteza analítica	49
3.4.1.2	Qualidade do procedimento analítico	49
3.5	BIOENSAIO.....	50
3.5.1	Criação de <i>Drosophila melanogaster</i>	50
3.5.2	Teste de genotoxicidade	50
3.5.2.1	Ensaio cometa em <i>Drosophila melanogaster</i>	50

3.5.2.2	Extração da hemolinfa.....	51
3.5.2.3	Preparação das soluções	51
3.5.2.4	Montagem das lâminas	51
3.5.2.5	Análise microscópica.....	52
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4	ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	55
4.1	QUALIDADE DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	55
4.2	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	56
4.3	ANÁLISE RADIOMÉTRICA DA ÁGUA	57
4.4	ANÁLISE DE METAIS TRAÇOS	58
4.5	BIOENSAIO: ANÁLISE GENOTÓXICA COM DROSOPHILA MELANOGASTER.....	61
4.6	ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DOS DADOS DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS E BIOENSAIOS	66
4.6.1	Agrupamento de dados relacionados as amostras do município de São José do Sabugi-PB.....	66
4.6.2	Agrupamento de dados relacionados as amostras do município de Abreu e Lima - PE.....	67
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

A vida de todos os seres que habitam a terra depende da água. Com o decorrer do tempo, as necessidades humanas e o crescimento da população passaram a exigir quantidades cada vez maiores de água e facilidade de acesso às fontes existentes. Ao mesmo tempo, eram procuradas novas fontes de suprimento, inclusive no subsolo. No Brasil, a água subterrânea abastece 87.214.502 habitantes em 2.917 municípios, e destes, 55,3% estão localizados em área rural (IBGE, 2009).

A água subterrânea pode ser contaminada por agentes químicos, como os defensivos agrícolas, como também pela presença de radionuclídeos naturais. A radioatividade natural pode ser medida em vários compartimentos do ecossistema como rochas, solos, ar, água, materiais de construção e alimentos. O Comitê Científico das Nações Unidas sobre os Efeitos da Radiação Atômica (UNSCEAR) estimou que aproximadamente 70% ($2,4 \text{ mSv.a}^{-1}$) da exposição que acomete o homem é originária das fontes de radioatividade natural como raios cósmicos, potássio (^{40}K), e das séries naturais do ^{238}U e ^{232}Th , e seus descendentes, principalmente o radônio. Os outros 30% são derivadas de contribuições das fontes antropogênicas como as atividades médicas ($1,0 \text{ mSv/a}$), explosões nucleares ($0,01 \text{ mSv/a}$) e ocupacional ($0,002 \text{ mSv/a}$) (UNSCEAR, 2008).

Os estudos radiométricos no Nordeste Brasileiro foram iniciados em 1972 pelas Empresas Nucleares Brasileiras S/A (NUCLEBRÁS) que, em conjunto com a Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM), possibilitaram a descoberta da presença de urânio, tório e seus descendentes no estado da Paraíba, onde se confirmou ocorrências anômalas de Material Radioativo de Ocorrência Natural (NORM).

Diante destas informações, o Grupo de Pesquisa em Radioecologia (RAE) do Departamento de Energia Nuclear (DEN) da Universidade Federal Pernambuco iniciou uma série de estudos radiométricos em diferentes municípios do estado da Paraíba (Santa Luzia, São José do Sabugi, São Mamede, Taperoá, Junco do Seridó e Pocinhos), onde foram evidenciadas diferentes áreas com presença de NORM. O grupo RAE vem realizando estudos de monitoramento com diferentes matrizes ambientais como o ar, as águas subterrâneas, as rochas e os solos (SANTOS JÚNIOR et al., 2017). Foram várias as conclusões, entre estas, a necessidade de realizar estudos que pudessem evidenciar possíveis efeitos biológicos.

Além dos estudos de monitoramento no estado da Paraíba, o grupo do SEAMB/CRCN em colaboração com o grupo RAE DEN/UFPE, tem investigado áreas de ocorrência uranífera na Região Metropolitana do Recife (RMR), Pernambuco, constatando a existência de

afloramentos de fosforito uranífero em regiões urbanizadas nos Municípios de Paulista e Abreu e Lima (SOUZA, 2006). Essas áreas possuem rochas associadas a uma camada geológica contendo calcários arenosos, cujas principais características são sua distribuição descontínua e espessura variando de centímetros a metros, onde foram detectados a presença de radionuclídeos.

Outro ponto observado nos estudos radioecológicos é a presença de metais pesados em sistemas hídricos, principalmente aqueles que representam sérios riscos à saúde da população. Deste modo, a utilização da Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), técnica sensível (RAVICHANDRAN et al, 2011) tem se tornado importante, em função do baixo limite de detecção, na determinação de baixas concentrações de metais (KRACHLER et al., 2012). Outros tipos de monitoração sobre as anomalias ambientais podem ser investigados por meio de bioindicadores.

Os bioindicadores são organismos que podem indicar alterações ambientais, estas espécies refletem o estado biótico e abiótico do impacto produzido sobre um habitat ou comunidade. O uso de invertebrados como uma ferramenta para monitorar a mudança ambiental é visto de forma positiva, pois eles ocupam os diferentes ecossistemas. Dentre os invertebrados, são destacados os insetos, conhecidos por sua sensibilidade e disponibilidade no ambiente terrestre, onde suas alterações nos padrões de comportamento têm sido utilizadas como ferramenta para justificar as perturbações ambientais em várias partes do mundo (PEARCE & VENIER, 2006; FREITAS et al., 2006; NICHOLS et al., 2007). No presente trabalho, foram utilizados a *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), espécie de inseto díptero que se alimentam de leveduras em frutos caídos em início de decomposição. Esta espécie é um dos animais mais utilizados em experiências de genética, sendo um dos mais importantes organismos modelo na biologia.

Na área de ecotoxicologia, a utilização da mosca *Drosophila melanogaster* tem demonstrado relevância crescente por apresentar parâmetros que podem ser analisados de forma qualitativa e quantitativa por meio do emprego de técnicas laboratoriais como o ensaio cometa. Trata-se de um ensaio rápido, sensível e relativamente barato que combina a simplicidade das técnicas bioquímicas usadas para detectar uma simples e/ou dupla quebra da cadeia de DNA e a abordagem unicelular dos protocolos citogenéticos (OSTLING E JOHANSON 1984, SINGH et al., 1988). Vale ressaltar que não foi encontrado nenhum estudo na literatura científica utilizando *D. melanogaster* para avaliar o efeito de radionuclídeos presentes nas áreas estudadas.

1.1 OBJETIVOS

Neste tópico serão abordados os objetivos do presente estudo.

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso de *Drosophila melanogaster* como bioindicador em águas de poços influenciadas por NORM.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Quantificar as concentrações do ^{222}Rn , ^{226}Ra , ^{238}U , ^{232}Th , ^{207}Pb , ^{112}Cd , ^{122}Sb e ^{95}Mo presentes na água dos poços artesianos dos municípios alvos deste estudo.
- b) Analisar a genotoxicidade das águas dos poços artesianos presentes nos municípios de Abreu e Lima (PE) e São José do Sabugi (PB) utilizando o ensaio cometa em *Drosophila melanogaster*;
- c) Associar a presença dos elementos químicos traços com os efeitos genotóxicos em larvas de *D. melanogaster* expostas às águas de poços presentes na área sob influência de NORM.

2 REVISÃO DE LITERATURA

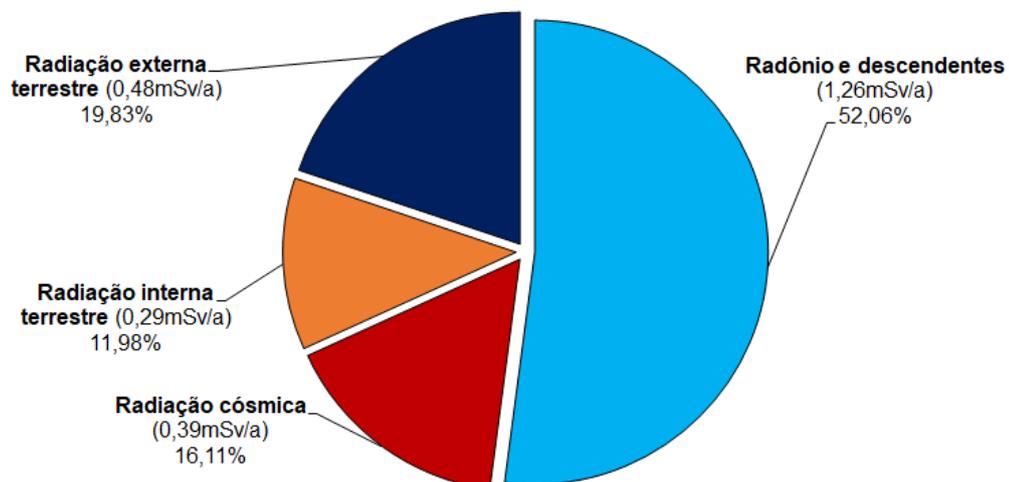
Neste tópico serão abordados aspectos relacionados a radioatividade ambiental, presença de radionuclídeos na água de poços artesianos e seus efeitos biológicos no bioindicador *Drosophila melanogaster*.

2.1 RADIOECOLOGIA E RADIOATIVIDADE AMBIENTAL

A radioecologia é considerada uma ciência multidisciplinar, que visa estudar as inter-relações entre a radiação ionizante ou de substâncias radioativas com o meio ambiente (SALBU, 2009). Outra preocupação desta área de estudo é a incorporação de radionuclídeos por inalação e/ou ingestão, bem como, a modelagem de circunstâncias que possam descrever efeitos sobre os seres vivos após as exposições (MARGERIT et al, 2015; SANTOS JUNIOR et al, 2017). Dentre as principais fontes de exposição está a radioatividade ambiental. Portanto, pode-se dizer que esta área de estudo desempenha um papel cada vez mais importante no controle das diferentes fontes de poluição ambiental (SALBU, 2009).

A radioatividade ambiental é consequência da exposição aos raios cósmicos, radionuclídeos cosmogênicos, aplicações antrópicas das radiações ionizantes e, principalmente, de elementos radioativos naturais. A maior parte da dose de radiação recebida pela população mundial provém de fontes naturais, que vêm atingindo a superfície da Terra ao longo do tempo. A Figura 1 contém detalhes sobre as diferentes exposições a fontes radioativas naturais.

Figura 1 - Dose individual média anual decorrente de fontes naturais



Fonte: UNSCEAR (2008).

O radônio e seus descendentes apresentam maior contribuição nesta exposição, com valor médio de taxa de dose efetiva de 1,26 mSv/ano, seguida pela radiação externa terrestre (0,48 mSv/ano), radiação cósmica (0,39 mSv/ano) e radiação interna terrestre (0,29 mSv/a), somando-se 2,42 mSv/ano (Figura 1) (UNSCEAR, 2008).

Os principais radionuclídeos naturais presentes na crosta terrestre desde sua origem são os radionuclídeos pertencentes as séries do urânio e do tório, além do isótopo radioativo de potássio (^{40}K) cujas meias-vidas são relativamente longas. Podem ser encontrados em diversos compartimentos ambientais como no ar, na água, no solo, nas rochas, nos vegetais e alimentos contribuindo com cerca 83% da dose média anual. Dessa porcentagem 13% decorre do ^{40}K , 53% do ^{222}Rn e seus descendentes, e 17% corresponde aos outros radionuclídeos das séries naturais do ^{238}U e do ^{232}Th (GESELL, 1997; UNSCEAR, 2000). A irradiação interna ocorre quando o radionuclídeo está dentro do corpo, incorporados pela inalação, ingestão ou inoculação (SOWMITHRA et al., 2015). Uma das causas da exposição é o fato de que a maioria destes radionuclídeos possui tempo de meia vida longo, compatível à idade da terra, e que ainda não decaíram substancialmente (RANI et al., 2015). Os raios cósmicos e os radionuclídeos cosmogênicos são responsáveis pelo restante da radiação natural, principalmente a irradiação externa (AXELSSON; RINGBOM, 2014).

A radioatividade natural depende de outros fatores como a altitude em relação ao nível do mar, o tipo e a quantidade de radionuclídeo incorporado. Portanto, as populações que vivem a milhares de metros de altitude são expostas a níveis de radiação cósmica superiores aquelas que residem ao nível do mar. Esta exposição também varia de acordo com as zonas térmicas da Terra: as zonas polares recebem um fluxo maior de partículas do que as zonas equatoriais, devido à presença do campo magnético terrestre, que desvia as partículas das regiões do equador (HEILBRON et al., 2004). Outro fator importante de exposição à radiação é a forma de vida que os indivíduos levam, como por exemplo, a utilização de determinados materiais de construção como areia, argila, cimento; o isolamento térmico dos ambientes, dentre outros, que também podem aumentar de forma considerável a exposição do homem à radiação natural (MAZZILLI, 2011). Os níveis de radiação natural variam consideravelmente dependendo da região, ou seja, existem áreas onde o nível de radiação natural é mais elevado como Guarapari, no Espírito Santo e São José dos Espinharas, na Paraíba (DOS SANTOS JUNIOR et al, 2017).

Por outro lado, as contribuições antropogênicas, que colaboram com 30% da radiação na qual os seres vivos estão expostos, podem contribuir para o aumento das concentrações dos radionuclídeos no ambiente (PEARSON et al., 2015). Como exemplos de atividades

antrópicas estão às operações relacionadas com o ciclo do combustível nuclear, uso dos radioisótopos na medicina, na indústria, em pesquisas e “*fallout*” consequente de testes nucleares. (GONZE et al., 2015).

2.1.1 Radionuclídeos investigados

Nesse tópico serão abordados os radionuclídeos investigados no presente estudo.

2.1.1.1 Urânio

Trata-se de um elemento químico classificado como metal na tabela periódica, constituído por vários isótopos. Dentre estes, destacam-se os isótopos naturais ^{234}U , ^{235}U e ^{238}U , com abundâncias isotópicas de 0,0054%, 0,7204% e 99,2742%, respectivamente. A principal ocorrência mineral é a uranita conhecida por pechblenda, podendo ser encontrada em águas naturais na forma de U^{4+} e UO_2^{2+} .

Sob condições de oxidação, o urânio é altamente móvel na água ficando no estado hexavalente formando complexos solúveis com carbonato e fosfato em pH neutro e com sulfato e fluoreto em pH ácido. Sob condições redutoras, o urânio predomina no estado tetravalente na forma estável de $\text{U}(\text{OH})_4$. Além de ser radioativo, o urânio também é quimicamente tóxico sendo transferido ao organismo por inalação, contato com a pele, água e alimentos. Esse radionuclídeo primordial e seus isótopos podem ser encontrados no ar, nas rochas, solos, e em águas superficial e subterrânea em condição de equilíbrio químico dinâmico, com razões isotópicas distintas (ROESER et al., 2012; BRADY; WEIL, 2013).

Avaliar os radionuclídeos das séries de decaimento do ^{238}U é importante para análise da composição química dos aquíferos, principalmente aqueles destinados ao consumo humano. A interação desses radionuclídeos com a água subterrânea ocorre por meio do processo α -recuo, onde a cada decaimento alfa é gerado uma energia suficiente para que o radionuclídeo filho percorra cerca de 20 nm em direção aleatória dentro do mineral portador do ^{238}U . Nesse processo físico, o radionuclídeo filho pode ultrapassar a interface água-mineral e interagir com a água subterrânea, podendo não ser afetado pelas propriedades químicas dessa matriz (KIGOSHI, 1971; FLEISCHER; RAABE, 1978; PORCELLI, 2008).

No Quadro 1 é possível verificar a série de decaimento do ^{238}U , onde se verifica os seus radionuclídeos, meias vidas físicas e energias de radiação.

Quadro 1 - Série de decaimento do ^{238}U

Nuclídeos	Meia-vida	Maiores energias de radiação (MeV) e intensidades		
		α	β	γ
^{238}U	4,468x10 ⁹ a	4,15 (23%) 4,19 (77%)	-	-
↓				
^{234}Th	24,1 d	-	0,103 (19%) 0,191 (81%)	0,063 (3,5%) 0,093 (4,0%)
↓				
^{234}Pa	1,18 m	-	2,29 (98%)	0,765 (0,30%) 1,001 (0,60%)
99,86% ↓ 0,14% ↓				
^{234}Pa	6,7 h	-	0,53 (66%) 1,13 (13%)	0,10 (50%) 0,70 (24%) 0,90 (70%)
↓				
^{234}U	2,48x10 ⁵ a	4,72 (28%) 4,77 (72%)	-	0,053 (0,2%)
↓				
^{230}Th	7,52x10 ⁴ a	4,62 (24%) 4,68 (76%)	-	0,068 (0,6%) 0,142 (0,07%)
↓				
^{226}Ra	1602 a	4,60 (5,5%) 4,78 (94,5%)	-	0,186 (4%)
↓				
^{222}Rn	3,825 d	5,49 (100%)	-	0,510 (0,07%)
↓				
^{218}Po	3,05 m	6,11 (100%)	0,33 (100%)	-
99,98% ↓ 0,02% ↓				
^{214}Pb	26,8 m	-	1,03 (6%)	0,295 (19%) 0,352 (36%)
↓				
^{218}At	2 s	6,65 (6%) 6,70 (94%)	0,67 (94%)	-
↓				
^{214}Bi	19,7 m	5,61 (100%)	3,26 (100%)	0,609 (46%) 1,120 (17%) 1,764 (17%)
99,96% ↓ 0,04% ↓				
^{214}Po	164 μs	7,83 (100%)	-	0,799 (0,014%)
↓				
^{210}Tl	1,32 m	-	2,3 (100%)	0,296 (80%) 0,795 (100%) 1,310 (21%)
↓				
^{210}Pb	22 a	3,7 (1,8x10 ⁻⁸ %)	0,017 (85%) 0,064 (15%)	0,047 (4%)
↓				
^{210}Bi	5,02 d	4,93 (60%) 4,89 (34%) 4,59 (5%)	1,155 (100%)	-
100% ↓ 1x10 ⁻⁵ % ↓				
^{210}Po	138,3 d	5,30 (100%)	-	0,803 (0,0011%)
↓				
^{206}Tl	4,19 m	-	1,520 (100%)	-
↓				
^{206}Pb	ESTÁVEL	-	-	-

Fonte: Silva (2014).

Concentrações elevadas de isótopos de urânio e seus descendentes no ar, água ou em alimentos podem levar a irradiação interna, normalmente baixa devido, principalmente, a sua baixa transferência para a corrente sanguínea que é de aproximadamente 1,4%.

Nos rins, é necessária uma quantidade de 10 a 30 mg diário de urânio solúvel para produzir a nefrotoxicidade, efeito toxicológico mais grave dos rins. Existe informação na literatura que comprova que a ingestão crônica de urânio pode levar à diminuição da função renal, devido a sua atividade química (AMARAL, 1994; AQUINO, 2006; ATSDR, 2011).

Os ossos também são importantes acumuladores biológicos de radionuclídeos de vida longa. O urânio apresenta concentrações maiores nesse tecido, devido a sua afinidade de suas cargas e raios dos íons, sendo considerados críticos para os estudos dos efeitos a longo prazo, resultando em retenção por grandes períodos e, conseqüentemente, prolongando a exposição (PRADO, 2007). Por ser um emissor alfa, oferece riscos radiobiológicos e químicos à saúde que podem desencadear doenças degenerativas graves incapacitantes (VIEHBERG et al., 2012).

A concentração média de urânio na água potável é de 3µg/L e a Portaria de Consolidação Nº 5 do Ministério da Saúde recomenda que o limite de potabilidade do urânio seja de 30µg/L (PORCELLI, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; NRIAGU et al., 2012; WU et al., 2014; ASIC et al., 2017; GOUGET, 2019).

2.1.1.2 Tório

O tório apresenta-se, em pequenas concentrações na maioria das rochas e solos. Na natureza ocorre na forma de ^{232}Th , possuindo 100% de abundância isotópica, além de ser emissor alfa e gama, com meia-vida de 14,05 bilhões de anos. O Quadro 2 apresenta a série de decaimento radioativo, tendo como precursor o isótopo ^{232}Th . Nessa tabela foram detalhadas informações como: radionuclídeos, meias vidas físicas e suas emissões por energia (HAZENFRATZ et al., 2016).

O tório é considerado insolúvel em água por ação de minerais de difícil dissolução, contudo, a formação de vários compostos inorgânicos (NO_3^- , H_3PO_4 , etc) e orgânicos (oxalatos, citratos, dentre outros), contribui para o favorecimento da sua mobilidade na água (LANGMUIR & HERMAN, 1980). O pH também pode favorecer a mobilização e solubilização do tório na água (LANGMUIR & HERMAN, 1980; FERRONSKY & POLYAKOV, 1982).

Quadro 2 - Série de decaimento do ^{232}Th

Nuclídeos	Meia-vida	Maiores energias de radiação (MeV) e intensidades		
		α	β	γ
^{232}Th	$1,39 \cdot 10^{10}$ a	3,95 (24%) 4,01 (76%)	-	-
↓				
^{228}Ra	5,75 a	-	0,055 (100%)	-
↓				
^{228}Ac	6,13 h	-	2,11 (100%)	0,34 (15%) 0,908 (25%) 0,96 (20%)
↓				
^{228}Th	1,913 a	5,34 (28%) 5,42 (71%)	-	0,084 (1,6%) 0,214 (0,3%)
↓				
^{224}Ra	3,64 d	5,45 (5,5%) 5,68 (94,5%)	-	0,241 (3,7%)
↓				
^{220}Rn	55,6 s	6,30 (~100%)	-	0,55 (0,07%)
↓				
^{216}Po	0,145 s	6,78 (100%)	-	
↓				
^{212}Pb	10,64 h	-	0,58 (100%)	0,239 (47%) 0,300 (3,2%)
↓				
^{212}Bi	60,5 m	6,05 (70%) 6,09 (30%)	2,25 (100%)	0,040 (2%) 0,727 (7%) 1,620 (1,8%)
64% ↓ 36% ↓				
^{212}Po	304 ns	8,78 (100%)	-	
↓				
^{208}Tl	3,1 m	-	1,80 (100%)	0,511 (23%) 0,583 (86%) 0,860 (12%) 2,614 (100%)
↓				
^{208}Pb	ESTÁVEL	-	-	-

Fonte: Silva (2014).

Quanto a exposição interna por meio da inalação, o tório pode permanecer nos pulmões durante um longo prazo, o que é relevante, visto que pode estar associado ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como o de pulmão, pâncreas e ossos (PONTEDEIRO, 2006). Após a ingestão, grande parte é excretado do corpo e o restante, entrará na corrente sanguínea, onde poderá ser depositado no esqueleto humano por muitos anos.

Dentre os radioisótopos formados nessa série radioativa, também classificada por $4n$ são destacados: ^{228}Ra emissor beta que possui meia vida física de 5,7 anos e o ^{220}Rn , que é um gás radioativo com meia vida física de 55,6 segundos. (LAMONTAGNE et al.; VARLEY et

al.; COLLINS et al.; FORTE et al.; POLKOWSKA-MOTREKON et al.; MEDLEY et al.; AOUN, 2015),

2.1.1.3 Rádío

O rádío é um radionuclídeo natural abundante e bastante difundido no meio ambiente, apresentando diferentes concentrações nos solos, rochas e fontes de águas, onde é encontrado em quatro formas isotópicas: ^{223}Ra ($T_{1/2} = 11,4$ dias), ^{224}Ra ($T_{1/2} = 3,7$ dias), ^{226}Ra ($T_{1/2} = 1622$ anos) e o ^{228}Ra ($T_{1/2} = 5,8$ anos) (IAEA, 1982). O ^{226}Ra e ^{228}Ra são provenientes das séries de decaimento natural do ^{238}U e ^{232}Th , respectivamente.

A crosta terrestre é a principal fonte de rádío no ambiente, a qual transferem grande parte desse elemento para água, através de minerais presentes em rochas e solos. A concentração de rádío nas águas subterrâneas pode variar, dependendo da combinação de vários fatores, tais como: a forma disponível no meio e na água, a quantidade presente no mineral, além dos parâmetros físico-químicos e condições para mobilidade no meio (VASILE et al., 2010). Águas que percolam rochas com maiores teores de ^{238}U e ^{232}Th (graníticas), tendem a ter maiores concentrações de rádío, diferente daquelas que circulam em aquíferos com rochas carbonáticas que possuem baixa concentração de U e Th (MICHEL, 1990).

A salinidade e o pH são outros fatores que podem influenciar no comportamento do elemento rádío na água. Valores elevados de rádío têm sido encontrados em meio hídrico que apresentam concentrações salinas elevadas, o que pode levar a sua lixiviação, causada pela interação da água do mar com a rocha aquífera (MOORE & SHAW, 1998). Foi observado o aumento da lixiviação em pH menores que 4, o qual pode ocorrer através de reações de hidrólise, adsorção ou formação de sais insolúveis (BOWEN, 1979; BENES, 1984).

O ^{226}Ra e seus produtos de decaimento são responsáveis pela maior fração da dose interna recebida pelo homem, devido às fontes naturais. Esse isótopo radioativo, quando incorporado ao sistema biológico possui características químicas análogas ao cálcio, concentrando-se nos ossos. Quando ocorre a desintegração do seu núcleo, há liberação de partículas alfas que, ao interagir com as células podem desencadear processos carcinogênicos, como o osteosarcoma, devido a absorção e incorporação do ^{226}Ra pelo tecido ósseo. Outra patologia que pode ser observada é o carcinoma de crânio devido, exclusivamente, a captação do ^{226}Ra . Portanto, este radionuclídeo pode oferecer alto potencial de risco à saúde dos seres humanos (MILVY & COTHERN, 1989; AMARAL, 2004; MEDLEY et al., 2015).

Pesquisas científicas sobre a distribuição do rádio na água têm sido de grande importância para compreender o comportamento desse radionuclídeo no ambiente. Recentemente, o rádio vem sendo quantificado em várias matrizes ambientais como: rochas, solos, águas subterrâneas, além dos alimentos e dos seres humanos. Em todas essas circunstâncias, os isótopos de maior interesse são o ^{226}Ra e o ^{228}Ra , principalmente o primeiro, que origina o ^{222}Rn (RANI et al, 2015).

2.1.1.4 Radônio

Nos últimos anos, os pesquisadores têm constatado que uma das fontes mais importantes de radiação natural em água de consumo humano é o radônio. Ele é um gás inerte, inodoro, insípido e sete vezes mais pesado que o ar. Seus filhos são isótopos de metais pesados que se fixam facilmente aos aerossóis presentes na atmosfera, e seus decaimentos radioativos ocorrem por emissões de partículas alfa, beta e também de raios gama. O radônio possui três isótopos radioativos e que são detalhados na Tabela 1.

Tabela 1- Isótopos naturais do radônio e suas propriedades.

Isótopo	Série de decaimento	Antecessor	Meia-vida	Isótopo filho
^{219}Rn	^{235}U	^{223}Ra	3,96 s	^{215}Po
^{220}Rn	^{232}Th	^{224}Ra	55,6 s	^{216}Po
^{222}Rn	^{238}U	^{226}Ra	3,82 d	^{218}Po

Fonte: UNSCEAR (2000).

A Tabela 1 apresenta os isótopos de radônio, onde o ^{219}Rn e o ^{220}Rn possui meias vidas físicas curtas, em relação ao ^{222}Rn , que é um dos mais importante dentre os três isótopos, do ponto de vista de proteção radiológica e ambiental. Por esse motivo, ele é comumente referido apenas como radônio.

O ^{222}Rn dissolvido na água é uma fonte de exposição humana, principalmente porque o gás é liberado da água de torneira e chuveiros, e incorporado à atmosfera do ambiente interno (NAZAROFF et al., 1987).

O ^{222}Rn , não interage com o trato respiratório: os danos são devido à inalação dos seus descendentes ^{218}Po , ^{214}Pb e ^{214}Bi , de meias vidas físicas curtas, que se depositam no pulmão. Atualmente o radônio é responsável pela segunda maior causa de câncer de pulmão, perdendo apenas para o fumo (ANGELL et al., 2009; MAZZILLI et al., 2011).

O radônio pode emanar das águas subterrâneas e seu aumento no ambiente interno provém de atividades diárias como o banho, o que contribui para o aumento da exposição, além de atividades domésticas como a lavagem de roupas e louças em residências nas regiões de elevado background e baixa temperatura ambiente, porém em níveis bem menores. Quando essas águas são utilizadas para abastecimento público, deve-se ter uma atenção especial, pois é estimado que as concentrações de radônio são comumente de 10 a 100 vezes maiores do que as águas superficiais ($3,7 \text{ Bq L}^{-1}$) (SONG, 2011; APPLETON, 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004), a concentração de radônio dissolvido na água para abastecimento público não deve ultrapassar 100 Bq L^{-1} .

Ainda sobre sua concentração, ele é dissolvido na água e escapa facilmente devido a turbulências. Rios e córregos possuem baixas concentrações de radônio, devido à agitação e mistura de águas, o que justifica maiores teores em águas subterrâneas (FIANCO, 2011).

Além das águas subterrâneas, é preciso avaliar as concentrações de radônio na água doméstica. A UNSCEAR estimou que pelo menos 1% da população mundial consome água que contém mais de 1000 Bq L^{-1} e que pelo menos 10% consomem água com mais de 100 Bq L^{-1} . No entanto, vale ressaltar que, não é o consumo de água que proporciona elevadas concentrações de radônio e sim, a inalação, especialmente durante o banho, visto que, na ingestão de água, o gás é eliminado rapidamente do organismo por ser quimicamente inerte.

A UNSCEAR (2000) estimou que o radônio e os seus produtos de decaimento contribuem com cerca de $3/4$ da dose efetiva anual recebida pelo homem, decorrente das fontes terrestres, e aproximadamente metade da dose recebida, em virtude de todas as fontes naturais. A maior contribuição dessa dose é devida à inalação em ambientes fechados (indoor). A dose equivalente efetiva total decorrente da exposição ao radônio e seus descendentes é de aproximadamente $1,3 \text{ mSv/ano}$ (MAZZILLI, et al., 2011). Desta forma é importante avaliar as concentrações de radônio para determinar os riscos decorrentes.

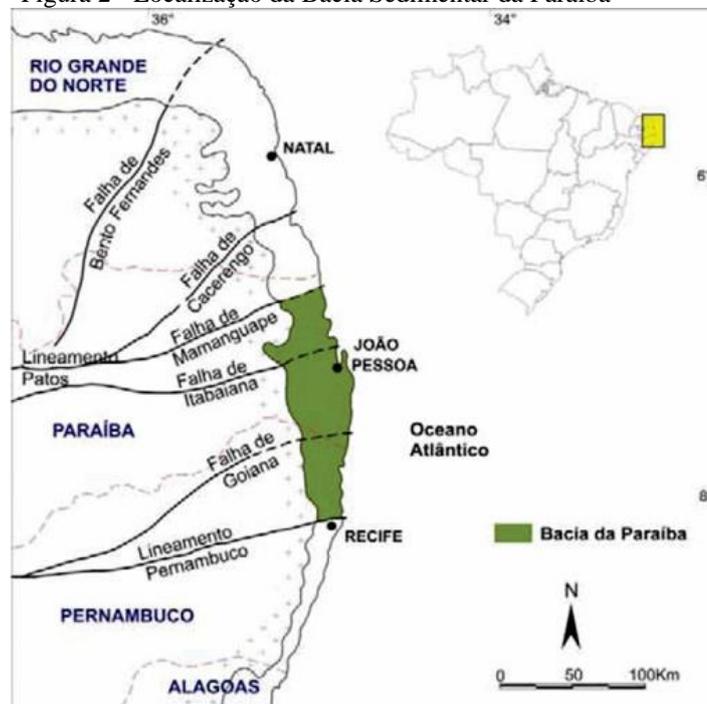
2.2 FOSFORITO URANÍFERO E ÁGUAS SUBTERRÂNEAS

Estudos realizados na faixa litorânea do estado de Pernambuco detectaram a existência de fosforito uranífero (DUARTE, 1949). As áreas dessas jazidas são de origem sedimentar, estudada e detalhada por Saad (1974) e Almeida (1978), no qual comprovaram que o fosforito do Nordeste brasileiro apresentava uma das mais altas concentrações de U_3O_8 , quando comparada com outras ocorrências mundiais. Essa descoberta desencadeou intensivas investigações, tanto por órgãos governamentais, como por empresas privadas, determinando

que a distribuição geográfica deste minério compreenda uma faixa descontínua (SOUZA, 2006).

Os afloramentos de fosforito uranífero em Pernambuco foram detalhados por Souza (2006), durante a realização de trabalhos de campo no bairro de Paratibe, município de Paulista, Pernambuco. Essas jazidas sedimentares, de origem marinha, possuem uma forma tabular de grande extensão lateral com espessura em sub-superfície, variando de alguns centímetros a vários metros, sendo encontradas na Bacia Sedimentar da Paraíba (Figura 2), depressão localizada entre o Lineamento Pernambuco e o Alto de Mamanguape, Paraíba, que perfaz uma área de aproximadamente 5.300 km² em sua porção emersa (SOUZA, 2006).

Figura 2 - Localização da Bacia Sedimentar da Paraíba



Fonte: SOUZA (2006).

Após estudos da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), foi localizada outra região do nordeste brasileiro, especificamente no estado da Paraíba, com depósito de urânio próximo ao município de São José de Espinharas-PB. Esse depósito ocorre em gnaisses e xistos pré-cambrianos com granitos intrusivos associados que foram alterados por processos metassomáticos (albitização e hematitização) com lixiviação da sílica e enriquecimento em fosfato. Trata-se de um depósito de urânio do tipo epigenético, apresentando semelhanças geológicas na constituição das rochas e solos, próximas ao município de São José do Sabugi-PB em estudo (BIZZI, 2003).

Frente a essas ocorrências históricas, os radionuclídeos presentes nas águas subterrâneas são os de maiores importâncias para o desenvolvimento desse estudo, uma vez que as águas doces e salgadas se infiltram nas rochas da crosta terrestre podendo permanecer ao longo de vários milhões de anos. Estes tipos de águas apresentam concentrações mais elevadas de urânio, rádio e radônio (CARVALHO et al. 2004). Para verificar a ocorrência e distribuição dos descendentes do urânio e tório, é necessário avaliar processos químicos, como hidrólise e precipitação, presentes nas águas subterrâneas, na qual limitam a disponibilidade e a mobilidade desses elementos (LANGMUIR, 1997). Além disso, para investigar a presença desses radionuclídeos em concentrações significativas, é necessário que os radionuclídeos ascendentes estejam presentes nas rochas do aquífero, inclusive apresentar condições físico-químicas favoráveis tais como: pH, Sólidos Totais Dissolvidos (STD), observando a sua mobilidade (CHMIELEWSKA et al., 2014).

Os recursos hídricos subterrâneos constituem um componente importante do abastecimento de água para consumo e outras aplicações, incluindo o meio rural, como a agricultura e a criação de gado. O aumento da exploração desses recursos através de atividades humanas pode comprometer a sustentabilidade. Relatórios sobre a ocorrência de elementos tóxicos, incluindo os elementos radioativos nas águas subterrâneas, tornaram imprescindível a monitoração para preservar a saúde das pessoas (SINGH et al., 1984; RAMOLA et al., 1988; SARIM et al., 1992; SINGH et al., 1995).

A qualidade da água pode ser avaliada através do comportamento dos organismos presentes no meio e pode ser considerada como uma medida de adequação para um uso particular, baseada em características físicas, químicas e biológicas selecionadas, comparadas com certos padrões. As substâncias e os padrões pelos quais a água é medida variam em todo o mundo (KERSKI, 2014). De acordo com a Portaria de Consolidação nº 5 do dia 28 de setembro de 2017, do Ministério da Saúde (MS) e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) são apresentados na Tabela 4 os parâmetros físico-químicos e radiométricos das águas subterrâneas.

Tabela 2 – Padrões de potabilidade

PADRÃO	PARÂMETROS	UNIDADE	VMP	ÓRGÃO
Físico-químicos	pH	-	6,0 - 9,5	MS
	Temperatura	° C	-	
Radiométricos	²²⁶ Ra	Bq/L	1	MS
	²²² Rn	Bq/L	11,1	USEPA

VMP: Valor Máximo Permitido; MS: Ministério da Saúde.

Fonte: USEPA (1999); Portaria de Consolidação nº 5 (2017).

No padrão físico-químico, os parâmetros pH e temperatura são de grande importância para avaliação da qualidade da água. Cada espécie tem seus valores na qual melhor se adapta e as alterações desses valores podem prejudicar o crescimento e a reprodução dos organismos vivos no ecossistema aquático, causando até sua mortalidade. Em contrapartida, esses indicadores também são importantes porque podem afetar a toxicidade de vários poluentes, como a amônia, e metais pesados como o alumínio (KUBITZA, 2003).

No padrão radiométrico, o nível desses radionuclídeos na água é importante, visto que os principais meios de entrada no organismo são por meio da ingestão e inalação (MAXWELL, 2015).

Outro fator importante de grande impacto na contaminação das águas subterrâneas são os metais pesados, devido a sua alta toxicidade, mesmo em baixas concentrações (MARCOVECCHIO et al., 2007; MOMODU e ANYAKORA, 2010). Por essa razão, pesquisas sobre esses tipos de águas devem ser realizadas com a finalidade de garantir os padrões de potabilidade para o consumo com segurança.

2.3 METAIS PESADOS

São grupos de elementos químicos da tabela periódica, cuja densidade é superior a 6g/cm^3 , que inclui os metais e os metalóides (AWODELE et al., 2013). Esses elementos naturais podem ser liberados no meio ambiente em grandes quantidades por meio das atividades antropogênicas como processos industriais, a destinação de resíduos, o uso de fertilizantes, dentre outras (ADRIANO, 2001; BOLAN et al., 2003; KABATA-PENDIAS, 2011).

Por não se degradarem com facilidade, podem acumular-se no solo, apresentando diferentes níveis de toxicidade, biodisponibilidade e mobilidade. Os metais se deslocam em

direção às águas subterrâneas a partir de uma variedade de meios, como intemperismo químico de rochas e solos, vegetação em decomposição, matéria animal, precipitação úmida e seca de materiais particulados atmosféricos, além da ação antropogênica (REINERS et al., 1975; CHARLES et al., 1994; MAHIMAIRAJA et al., 2005; KABATA-PENDIAS, 2011; BOLAN et al., YOUNG et al., 2013).

Pode-se afirmar que, os metais disponíveis migram livremente através da lixiviação, sendo capaz de aumentar gradualmente sua concentração quando permanece no ambiente aquático, o que facilita sua absorção pelos organismos (SHAH et al., 2012).

Os metais pesados, em sua maioria, são extremamente tóxicos devido à sua solubilidade na água e prejudiciais para a vida humana e animal, mesmo em baixas concentrações (ARORA et al., 2008). A sua excessiva utilização em aplicações industriais e seu acúmulo nos solos agrícolas, torna-os poluentes ambientais comuns na atualidade, afetando assim, a qualidade e a segurança alimentar (POLETO e MARTINEZ, 2011; ALI et al., 2013). Os metais pesados também podem estar associados à neurotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em seres humanos (HANG et al., 2008; DIVAN JUNIOR, 2009; MACHADO et al., 2001).

Como a maior parte da contaminação é causada por atividades antropogênicas, os metais pesados mais relevantes são diretamente dependentes da área geográfica e condições geológicas (GUILLÉN et al., 2012; BOLAN et al., 2014). Na Tabela 3 são detalhados os metais mais relevantes para estudos ambientais, principalmente em água de consumo humano, os quais serão objeto desse estudo.

Tabela 3 – Valor máximo permitido das concentrações de metais pesados

Metais Pesados	VMP
Molibdênio (Mo)	-
Cádmio (Cd)	5
Antimônio (Sb)	5
Chumbo (Pb)	10
Tório (Th)	-
Urânio (U)	30

VMP: Valor Máximo Permitido. Unidade em µg/L.

Fonte: Portaria de consolidação Nº 5 (2017).

Devido à sua toxicidade, influência ambiental e natureza bioacumulativa no ambiente, os metais pesados são classificados como poluentes perigosos (ALI et al., 2019). Desta forma, é

necessário avaliar a contaminação dos metais pesados nos recursos subterrâneos em consequência das fontes e poços como únicos suprimentos de água potável na maioria das áreas rurais.

2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS

A utilização de métodos químicos, radioquímicos e biológicos é importante para a avaliação da qualidade da água utilizada pela população. Dentre as técnicas utilizadas para a avaliação química e radiométrica da água são destacadas a Espectrometria de cintilação líquida e Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Estas técnicas foram empregadas no presente estudo e serão detalhadas a seguir.

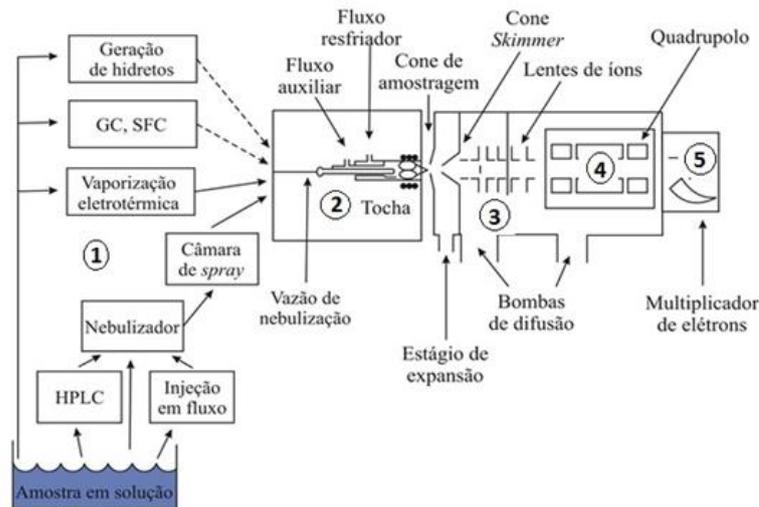
2.4.1 Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)

A espectrometria de massa atômica é uma técnica muito utilizada na identificação de elementos em amostras de diferentes matrizes. Esta técnica consiste na separação de elementos através dos seus próprios íons por meio da relação massa/carga (m/z). Para isto o equipamento ICP-MS foi desenvolvido e lançado comercialmente em 1983 (VANDECASTEELE; BLOCK, 1997).

A espectrometria de massa atômica possui alta sensibilidade (faixa de concentração de partes por trilhão), com bom custo/benefício, visto que tem a capacidade de realização de rápidas análises de múltiplos íons, tornando-se a técnica de referência para esse tipo de investigação (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Outra vantagem do ICP-MS são os baixos valores para os limites de detecção, que variam de 0,02 a 0,7 $\mu\text{g/L}$ (FEIST; MIKULA, 2014).

O equipamento ICP-MS (Figura 3) possui cinco partes principais: (1) sistema de introdução de amostras (nebulizador); (2) fonte de íons (plasma indutivamente acoplado); (3) interface de focalização dos íons; (4) sistema analisador de massas; (5) transdutor (multiplicador de elétrons) (NUNES, 2009).

Figura 3 - Esquema do espectrômetro de massas tipo ICP-MS



Fonte: Holler; Skoog; Crouch (2009).

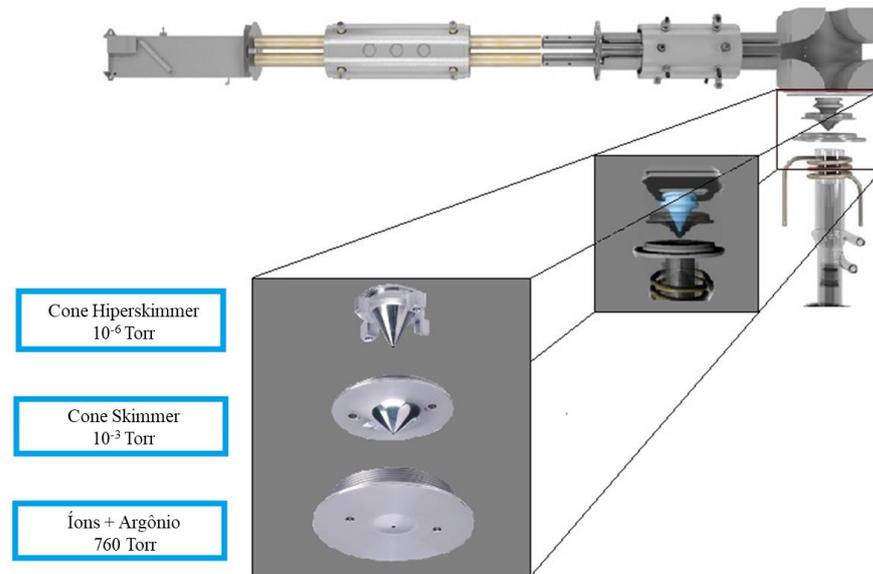
A introdução de amostra no ICP-MS em geral é na fase líquida, por apresentar melhores condições de homogeneidade, facilidade de manipulação e disponibilidade de soluções padrão de referência para calibração.

O sistema de introdução mais usual contém uma bomba peristáltica, responsável por conduzir a amostra até um nebulizador. Este é levado à câmara de nebulização, onde as gotas maiores são separadas das menores e descartadas (>95% do volume da amostra). Após esse processo, a amostra em forma de aerossol é conduzida, por um fluxo de argônio, até o plasma, formado pela tocha, onde, posteriormente, é ionizada (NUNES, 2009).

O plasma é considerado um condutor elétrico, visto que é conhecido como um gás parcialmente ionizado, formado eletromagneticamente por indução de radiofrequência acoplada ao gás argônio, contendo alta concentração de elétrons e cátions. O plasma opera a temperaturas muito elevadas que podem chegar a 10.000 K, apropriada para promover a ionização das espécies elementares (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; NUNES, 2009; ZHANG et al., 2013).

Os íons formados no plasma são direcionados a um cone de amostragem através de uma bomba de difusão, que se encontra a baixa pressão. Em seguida, o gás se expande devido à baixa pressão e passa por um segundo cone, *Skimmer*, e grande parte do argônio é bombeado para fora. Finalmente, o feixe de íons se expande e passa por um terceiro cone, *hiperskimmer*, onde será direcionado para o sistema analisador de massas quadripolar. A principal função da interface (Figura 4) é reduzir a pressão e densidade do feixe, minimizando a perda de íons. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

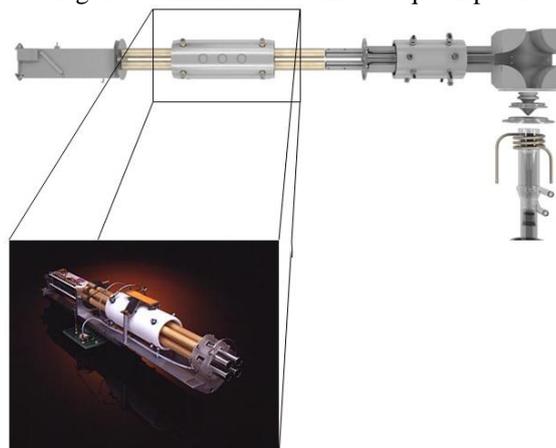
Figura 4 - Interface focalizadora de íons



Fonte: Adaptado de PerkinElmer (2009).

O sistema analisador de massas quadripolar é o mais comum espectrômetro de massas utilizado (Figura 5), isso devido a sua robustez, rapidez e por apresentar menor custo em relação a outros analisadores (QUEVAUVILLER, 2005). O quadripolo é baseado em dois pares de cilindros paralelos e equidistantes a um eixo central, onde são aplicadas diferenças de potenciais com o objetivo de selecionar e conduzir os íons de interesse (GINÉ-ROSIAS, 1999).

Figura 5 - Analisador de massas quadripolar



Fonte: Adaptado de PerkinElmer (2009).

Em um dos pares do cilindro, uma diferença de potencial positiva é aplicada e no outro, uma negativa, formando um campo bidimensional. Esse campo atrai os íons, que se dirigem ao quadripolo, com força proporcional a sua intensidade e sua carga. Para obter um espectro de massas com o dispositivo, os íons de uma determinada razão m/z (massa/carga)

são acelerados entre o espaço das barras e são convertidos em moléculas neutras, onde alcançarão o transdutor. Geralmente, os quadropolos distinguem os íons através da unidade de massa atômica (GINÉ-ROSIAS, 1999; QUEVAUVILLER, 2005).

2.4.2 Espectrômetro de Cintilação Líquida

O Espectrômetro de Cintilação Líquida (LSC) (Figura 6) foi o primeiro equipamento usado para detectar radiação ionizante, no final da década de 40, quando foi desenvolvido para utilização da medição de radiação beta. É uma das técnicas mais úteis para detecção e espectroscopia de radiações (ESCOBAR et al., 1996; TAUHATA et al., 2003; TURNER, 2007).

Figura 6 - Espectrômetro de Cintilação Líquida, Quantulus 1220, da Perkin Elmer



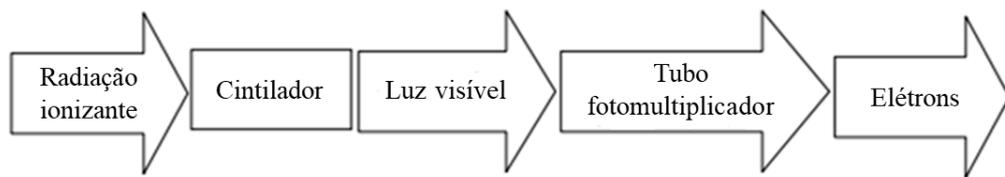
Fonte: Amaral (2018).

Este equipamento opera com um background extremamente baixo, pois possui duas formas de blindagem, além de conter dois detectores, revestidos por uma parede de 200 mm de chumbo e um circuito eletrônico de anticoincidência (CDTN, 2019).

Esse método utiliza uma solução cintiladora (coquetel cintilador) cuja função é receber partículas ionizantes e converter em fótons com comprimentos de onda adequados à máxima sensibilização da fotomultiplicadora utilizada, além de servir de suporte de fonte para a

amostra radioativa que se deseja medir. Essa energia das radiações pode ser absorvida através da excitação de moléculas da solução, que vai excitar os elétrons das camadas eletrônicas das moléculas do cintilador, e estes, perderão energia, emitindo fótons com intensidade proporcional à energia da radiação que foi absorvida. A luz gerada é direcionada para dentro de um tubo fotomultiplicador, envolvida com cobre e cádmio, para logo após ocorrer a geração de pulsos elétricos que migrarão para um sistema eletrônico de contagem (Figura 7) (SANTOS, 2010; OLIVEIRA, 2014).

Figura 7 – Conversões de energia ocorridas no Espectrômetro de Cintilação Líquida



Fonte: OKUNO; YOSHIMURA (2010).

A técnica é padrão-ouro na determinação do radônio em água pela sua simplicidade de metodologia e sua facilidade de automação (EATON et al., 1998).

2.4.3 Bioindicadores: Avaliação do impacto ambiental em recursos hídricos

Para verificar os efeitos biológicos provocados por agentes químicos e/ou físicos no meio ambiente é necessário utilizar organismos testes capazes de absorver e demonstrar tais efeitos e desta forma indicar a magnitude dos impactos ambientais no ecossistema (BUSS et al., 2003; CALLISTO et al., 2004). A utilização de bioindicadores como avaliadores das condições ambientais têm sido amplamente empregado para fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre o impacto de inúmeros poluentes e diversos agentes tóxicos (CARIGNAN e VILLARD, 2002; CARO, 2010; URBAN et al., 2012).

Um indicador biológico adequado deve ter as seguintes características: (a) ser taxonomicamente bem definido e facilmente reconhecível por não especialistas; (b) apresentar distribuição geográfica ampla; (c) ser abundante e de fácil coleta; (d) ter baixa variabilidade genética e ecológica; (e) dispor de características ecológicas bem conhecidas; e (f) ter possibilidade de uso em estudos laboratoriais (JOHNSON et al., 1993).

Um complemento a testes convencionais que utilizam organismos como bioindicadores, conhecido como teste toxicológico, é uma das ferramentas do campo da ecotoxicologia ou toxicologia ambiental. Esta ciência estuda os diversos efeitos adversos das

substâncias tóxicas sobre o organismo e conseqüentemente o meio ambiente. A presença de agentes químicos e físicos no meio ambiente pode causar inúmeras alterações nos organismos que entram em contato com estas substâncias, entre os efeitos observados merecem destaques os efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (NEWMAN; UNGER, 2003).

Frente a essas alterações, os aspectos comuns entre organismos diferentes se acentuam, principalmente, ao nível molecular, e por isso, muito dos bioindicadores moleculares possuem a vantagem de poderem ser aplicados a uma ampla variedade de organismos vivos (LAMA; GRAY, 2003). Este tipo de bioindicador é de grande importância como sinalizador inicial da exposição aos contaminantes e de seus efeitos.

Ao nível do DNA, pode ser utilizado o ensaio cometa como avaliador de genotoxicidade. A análise cuidadosa de todos os parâmetros anteriormente citados possibilita avaliar as condições fisiológicas dos animais em um ecossistema específico (ARIAS et al., 2007).

De forma geral, quanto mais rápida for a identificação de fatores que propiciem condições adversas ao ambiente, maiores serão as chances de redução destes impactos aos níveis superiores da organização biológica como comunidades e ecossistemas (ARIAS et al., 2007). Uma imensa gama de organismos é utilizada como bioindicador, dentre estes estão os insetos, que nos ecossistemas terrestres se justifica pela sua relação na decomposição de matéria orgânica, na ciclagem de nutrientes, no fluxo de energia, na polinização e na dispersão de sementes, além de serem reguladores de populações de plantas, de animais e de outros organismos. Essa relevância auxilia na conservação da biodiversidade, pois esses artrópodes estão inseridos em praticamente todos os ambientes em virtude das suas peculiaridades estruturais e fisiológicas que permitem adaptações a condições ambientais bastantes distintas (LOPES, 2008).

Portanto, a utilização de insetos em inventários e estudos ambientais, torna-se essencial para o monitoramento do meio ambiente, onde se consegue averiguar as alterações ocasionadas pelo próprio ambiente, bem como, as causadas pela ação do homem, que ameaçam a integridade dos ecossistemas (NASCIMENTO et al., 2001). O monitoramento dos insetos nos ecossistemas permite as prevenções de impactos nos diferentes ambientes. Assim, à medida que ocorrem o resgate da diversidade vegetal e o equilíbrio ambiental, os insetos respondem da mesma forma, cumprindo a sua função de bioindicador (WINK et al., 2005). Dentre os insetos, a *Drosophila melanogaster* vem se destacando, devido as suas características intrínsecas.

2.4.3.1 *Drosophila melanogaster*

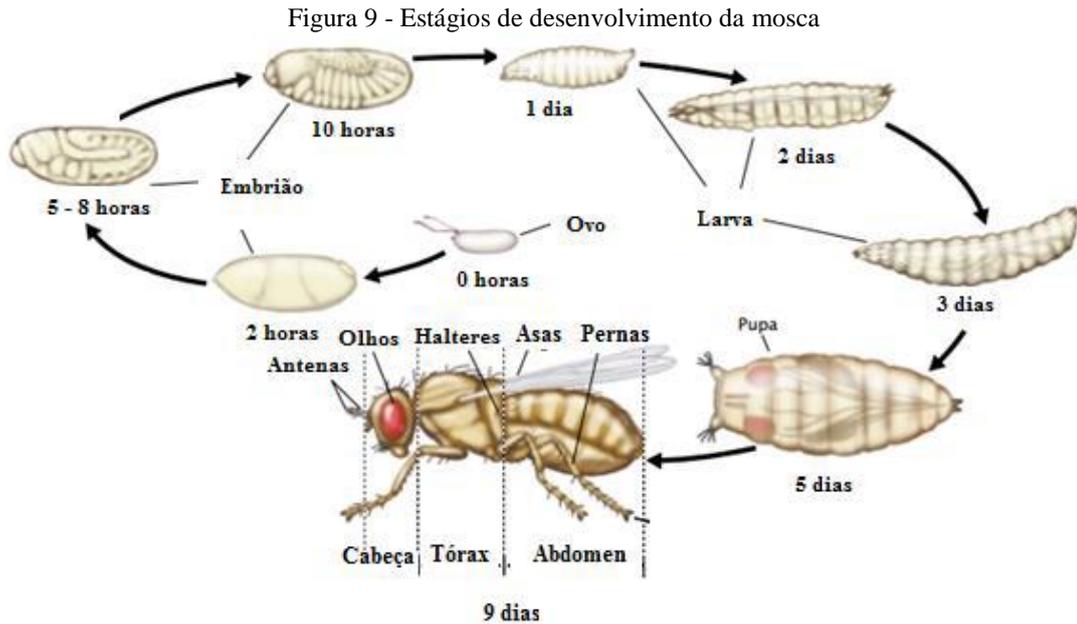
A *Drosophila melanogaster* (Figura 8) foi inicialmente estudada por Castle, em 1901, e utilizada para experimentos de genética por Morgan, em 1909. É uma espécie da África Central que vivem em ambientes tropicais e subtropicais, porém, hoje é considerada cosmopolita, ou seja, pode ser encontrada tanto em países de clima quente como em países de clima frio, devido a sua facilidade de adaptação. Nos países frios, durante o inverno, pode permanecer abrigada em locais quentes como padarias, porém no verão, torna-se migrante, o que pode dificultar a sua reprodução (ROBERTS, 1998).

Figura 8 – *Drosophila melanogaster*



Fonte: GOMPEL (2008).

É um inseto tipicamente holometábolo, ou seja, possui metamorfose completa durante o seu desenvolvimento, na qual pode ser dividido em quatro estágios no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 9). No laboratório, são usualmente mantidas a 25°C: condição que leva ao desenvolvimento das moscas (ovo até adulto) (ASHBURNER, 2005). Nesse período, os ovos são depositados pelas fêmeas no meio de cultura, podendo colocar até 100 ovos por dia e, essa fase embrionária leva aproximadamente 24 horas. Assim que os ovos se transformam em larvas de primeiro estágio, ela começa a se alimentar imediatamente. Nessa fase passam por duas mudas: do primeiro para o segundo estágio e do segundo para o terceiro estágio. As de primeiro estágio se alimentam na superfície do meio, enquanto que, as de segundo e terceiro escavam o meio para se alimentar. A larva de terceiro estágio, que já está madura, deixa o meio para procurar um local adequado onde formará a pupa, de onde em aproximadamente três dias o adulto emergirá (ASHBURNER, 2005). Os estágios de desenvolvimento duram em torno de 10 dias.



Fonte: Adaptado de PIERCE; BENJAMIN (2012).

Taxonomicamente, pertence ao gênero *Drosophila*, que possui oito subgêneros e cerca de 1.400 espécies, apresentando alta diversidade e ampla distribuição geográfica (WHEELER, 1986). Nas últimas décadas a *Drosophila melanogaster* tem se firmado como o principal organismo modelo multicelular. As vantagens de se trabalhar com esta espécie são muitas: o baixo custo de manutenção, rápido ciclo de vida, grande quantidade de material de consulta sendo livros, sítios na internet (Flybase), banco de dados do Berkeley *Drosophila* Genome Project associado à enciclopédia de *Drosophila*, entre outros, cobrem todos os aspectos da genética e biologia molecular da mosca (ROBERTS, 1998; ASHBURNER, 2005).

Payne et al. (2013) explicam que essas características tornaram as moscas-da-fruta uma ferramenta biomédica importante para identificação de mutações. Pesquisadores podem analisar os impactos ambientais causados pelo desenvolvimento de diferentes insetos a partir de estudos com essas moscas. Embora sejam espécies diferentes do homem algumas proteínas e genes humanos são encontrados na formação das asas de espécimes de *Drosophila melanogaster* (AHMAD et al., 2014).

A maioria dos insetos, incluindo a *D. melanogaster*, depende muito de seu sistema olfativo quando realiza atividades elementares, como alimentação, acasalamento, oviposição e prevenção de predadores. No sistema reprodutor, o feromônio sexual acetato de cis-vaccenyl (cVA), produzido pelos machos adultos da *Drosophila melanogaster*, desempenha um papel significativo e específico do sexo na comunicação entre machos e fêmeas. Nos machos demonstra um comportamento agressivo, suprimindo o namoro com outros machos

(KURTOVIC et al., 2007; WANG & ANDERSON, 2010) e aumenta a receptividade sexual em fêmeas (KURTOVIC et al., 2007). O cVA também age como um feromônio promotor de agregação, atraindo tanto machos quanto fêmeas para a alimentação (BARTELT, 1985; LEBRETON et al., 2012; SCHLIEF & WILSON, 2007; WERTHEIM, 2003). Como a comunicação por feromônios e a recepção de odores de alimentos ocorrem naturalmente em conjunto, supõe-se que, esses odores também estão ligados no nível neuronal. O vinagre representa um odor de comida altamente atraente para a *D. melanogaster* (Semmelhack & WANG, 2009) e recentemente foi demonstrado que as fêmeas alimentadas com a mistura Cva+vinagre são mais atraídas do que apenas com vinagre, em diferentes testes comportamentais, ao contrário dos machos (LEBRETON, 2015).

A imunidade dos insetos adultos está baseada em mecanismos celulares de defesa, tais como a fagocitose, nodulação e encapsulamento e mecanismos humorais, que incluem a coagulação da hemolinfa, a ativação da fenoloxidase, o que leva à melanização, e à produção sistêmica de peptídeos antimicrobianos (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006; LEMAITRE & HOFFMANN, 2007). Os mecanismos de defesa celular e humoral ocorrem em conjunto (Dunn, 1986). Os hemócitos, componentes celulares da imunidade dos insetos, são capazes de fagocitar, de promover a nodulação e encapsulamento de patógenos, além de participar da eliminação de toxinas e tecidos anormais ou mortos. Além do mais, circulam livremente na hemolinfa, mas a partir do momento que microrganismos invadem o corpo, rapidamente migram para o local da infecção e, eventualmente fagocitam e destroem os invasores (SILVA et al., 2000; RUSSO et al., 2001).

Nas larvas, a imunidade inata facilitou a compreensão de vários aspectos do desenvolvimento das células do sangue (EVANS et al., 2003; WOOD & JACINTO, 2007; GOLD & BRÜCKNER, 2014). A hematopoiese da *Drosophila* pode ser dividida na linhagem de hemócitos embrionários ou larvais, que se originam no embrião e se expandem na larva, e na linhagem dos hemócitos linfáticos (GOLD & BRÜCKNER, 2014; MAKHIJANI & BRÜCKNER, 2012). Destacando os hemócitos embrionários, larvas de *Drosophila* compreendem principalmente plasmatócitos (macrófagos) e algumas células de cristal (GOLD & BRÜCKNER, 2014). Os hemócitos do embrião persistem e colonizam segmentalmente bolsos hematopoiéticos (HPs) repetidos e terminais, localizados entre as camadas da epiderme e as camadas musculares da parede do corpo da larva (MAKHIJANI et al., 2011; MAKHIJANI & BRÜCKNER, 2012). Os macrófagos auto-renováveis residem, predominantemente, em microambientes teciduais locais, e sua linhagem das primeiras células sanguíneas emergem durante o desenvolvimento (HOLZ et al., 2003; MAKHIJANI et

al., 2011). Essa população de células sanguíneas é considerada similar aos macrófagos teciduais auto-renováveis de vertebrados, uma linhagem mielóide independente recentemente identificada em uma variedade de espécies (GOLD & BRÜCKNER, 2014; SIEWEKE & ALLEN, 2013; DAVIES, 2013). No entanto, na *Drosophila*, algumas ou todas essas células residentes também mostram plasticidade para dar origem a outros tipos de células sanguíneas como células de cristais (Bretscher et al., 2015; Leitao & SUCENA, 2015).

Os hemócitos larvais são predominantemente residentes (sésseis), mas estão em um estado estacionário dinâmico entre vários HPs. Eles são progressivamente liberados em circulação, em especial quando a larva do terceiro estágio se aproxima da puparização (LANOT et al., 2001; MAKHIJANI et al., 2011; MAKHIJANI & BRÜCKNER, 2012). Desafios imunológicos, lesões ou distúrbios mecânicos levam a uma prematura, no último caso reversível, mobilização de hemócitos residentes para a hemolinfa (GOLD & BRÜCKNER, 2014; MAKHIJANI et al., 2011; MARKUS et al., 2009).

A partir dessas informações, o modelo *Drosophila melanogaster* está entre os organismos mais estudados em diversas áreas e, na última década, tem sido estudada também na área da genotoxicidade por meio do Ensaio Cometa (GAIVÃO & SIERRA, 2014; VERÇOSA, 2015b). Essas espécies são bastante adequadas para lidar com questões relativas à saúde humana. Mesmo evolutivamente separados, a mosca e o ser humano compartilham mecanismos moleculares básicos, como os que são desencadeados em doenças neurodegenerativas (LENZ et al, 2013). Este organismo é extremamente importante para todo tipo de processos relacionados com a saúde humana, funcionando como ótimo biomarcador para a resposta aos danos no DNA (CARMONA et al, 2011a; GALVÃO E SIERRA 2014).

Estudos realizados sobre a análise da poluição da água do rio Capibaribe no estado de Pernambuco demonstraram que a *Drosophila melanogaster* pode ser utilizada como um bioindicador (OLIVEIRA, 2019). Outros estudos também utilizaram este organismo como bioindicador na presença de radônio em diversas matrizes, como o ar e a água, demonstrando seu uso frente a radiação (CARMO NETO, LIMA, 2019).

Na detecção dos efeitos biológicos, ocasionados pelas diversas substâncias lançadas diariamente no meio ambiente, a ecogenotoxicologia, faz uso de inúmeros biotestes úteis na avaliação de danos genotóxicos e toxicológicos, na qual pode-se destacar o Teste de Ames ou Ensaio de Mutação Gênica Reversa em *Salmonella typhimurium* ou Teste *Salmonella-microsoma*; Teste do Micronúcleo (MN) – é o ensaio, *in vivo*, mais amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (ARIAS et al, 2007); e o Ensaio

Cometa, teste de genotoxicidade capaz de detectar danos em moléculas de DNA induzidas por diferentes agentes químicos e ou físicos (CARMONA et al., 2011a; SHARMA et al.; SHUKLA et al., 2011; GUANGGANG et al., 2013; LUCAS et al., 2017). Esta técnica foi à escolhida para este trabalho e será detalhada no próximo tópico.

2.5 ENSAIO COMETA

Consiste em um teste de genotoxicidade recomendado para o monitoramento ambiental de águas (PANDEY et al., 2011) e populações expostas, além de dejetos industriais, domésticos e agrícolas (BÜCKER et al, 2006), bem como, na estimativa de riscos genéticos de misturas complexas e genotoxicidade induzida por agentes físicos como raios X e radiação gama (PAZ-Y-MIÑO et al, 2007). Pode ser realizado em animais e vegetais (SOUZA, 2005), requerendo células vivas, porém com ausência de atividade mitótica (CASTRO, 2004; BÜCKER et al, 2006). É considerada uma técnica simples, de rápida performance e alta sensibilidade (BELPAEME et al., 1998).

Outra vantagem da técnica é a utilização de pequeno número de células necessárias para análise, além da possibilidade de trabalhar com células de quase qualquer tipo de organismo, a habilidade de medir vários danos de DNA com alta precisão, asseguraram a indispensabilidade do ensaio em biomonitoramento e estudos clínicos. Vários produtos químicos, fatores físicos, nanopartículas, drogas, dentre outros, foram testados quanto à genotoxicidade com essa técnica (BRENDLER-SCHWAAB, 2005; GLEI et al., 2016; MOLLER, 2018).

Portanto, as utilizações e fácil desempenho levam à rápida aplicação do ensaio cometa em vários campos, como análises de genotoxicidade (SPEIT & HARTMANN, 1999; TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003; COLLINS, 2004), biomonitoramento da população humana (COLLINS et al., 1998; SOMOROVSKÁ et al., 1999; KASSIE et al., 2000; MØLLER et al., 2000; FAUST et al., 2004; HOOFFMANN et al., 2005; BURLINSON et al., 2007; DUSINSKA & COLLINS, 2008; URIOL et al., 2013) e reparo de DNA (COLLINS & HORVÁTHOVÁ, 2001; COLLINS et al., 2001; COLLINS & GAIVÃO, 2007; GAIVÃO et al., 2009; DUSINSKA E COLLINS, 2010). Recentemente, tornou-se mais popular como mecanismo para estudar efeitos genotóxicos de poluentes ambientais em diferentes animais, incluindo os insetos (MUKHOPADHYAY et al., 2004; SIDDIQUE et al., 2005; YOUSEF et al., 2010; CARMONA et al., 2011a; SHARMA et al., 2011; SHUKLA et al., 2011; GUANGGANG et al., 2013; LUCAS et al., 2017).

O Ensaio Cometa ou eletroforese em gel de célula única (SCGE) é um teste realizado em eletroforese em um meio alcalino que permite avaliar as alterações do DNA de células individuais. Essa metodologia foi descrita por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh et al. (1988). A migração do DNA durante o ensaio cometa ocorre através de diferentes mecanismos, dependendo do nível de danos no DNA e das condições de eletroforese. Fragmentos lineares de DNA de fita simples representam o principal componente do ensaio cometa (FAIRBAIRN et al., 1995).

A técnica requer manipulações muito cuidadosas com as amostras para evitar a indução de quebras de fita de DNA durante a preparação da lâmina, devido à alta sensibilidade do cometa aos danos no DNA (SZETO et al., 2005; ROJAS et al., 2014).

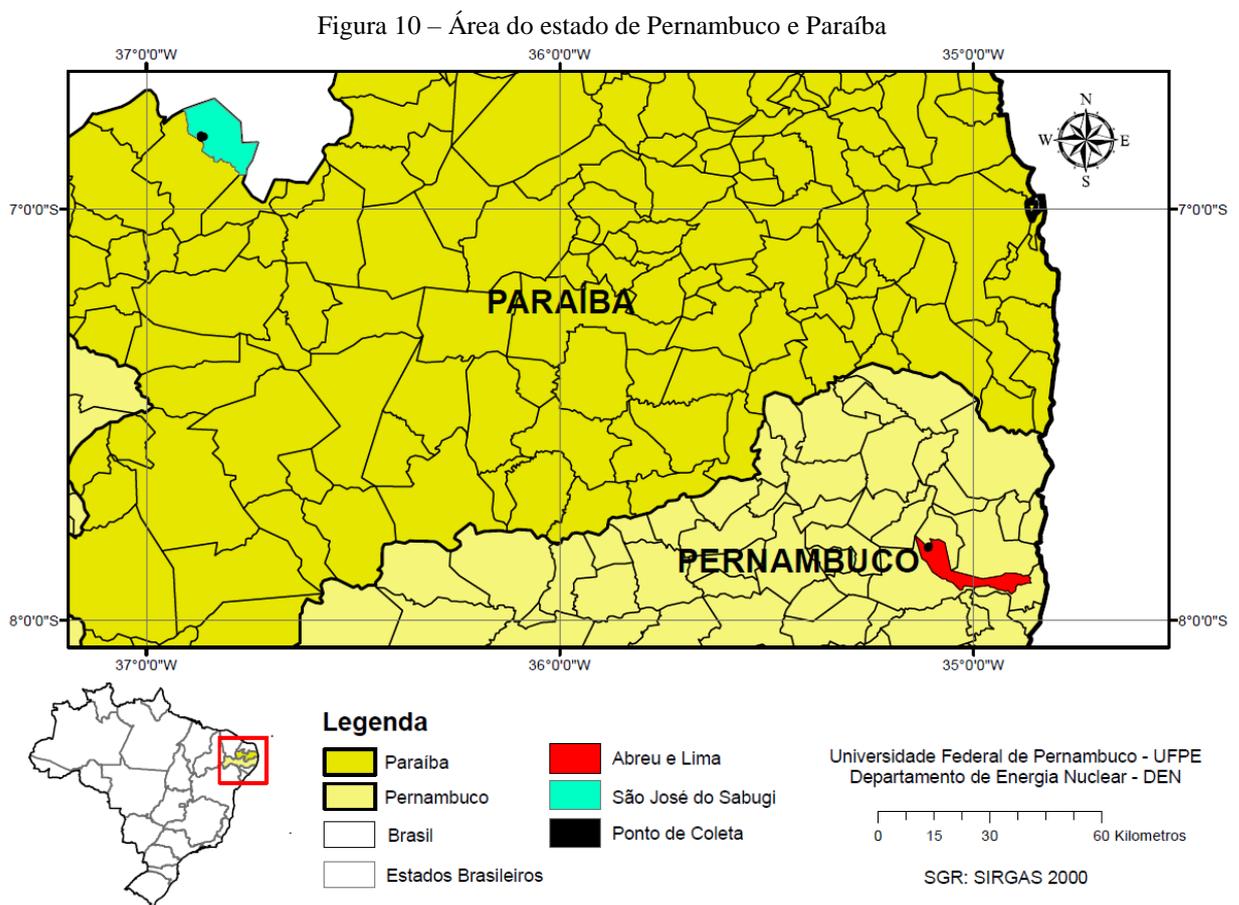
Estudos realizados por meio do ensaio cometa utilizando *Drosophila melanogaster*, demonstraram que o teste pode ser utilizado para avaliar os danos ocasionados pela radiação ionizante (CARMONA, 2011b; PASHA, 2016). Outras pesquisas utilizando esse teste para analisar diferentes compostos químicos, recomendaram seu uso para avaliar a genotoxicidade frente ao animal em estudo (SHUKLA et al.; SHARMA et al, 2011).

3 METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido na Região Metropolitana do Recife, no município de Abreu e Lima, Pernambuco e no sertão Paraibano, no município de São José do Sabugi, Paraíba. A escolha dessas áreas foi devido a presença da radioatividade ambiental consideradas anômalas nessas regiões, investigadas por Amaral (2018), Silva (2018), Damascena (2019), Araújo (2019), cujos radionuclídeos e elementos químicos foram quantificados em águas de poços utilizadas pela população. A monitorização das águas de poços também foi realizada, principalmente, através das alterações de DNA da *Drosophila melanogaster* utilizando o Ensaio Cometa.

3.1 ÁREAS DE ESTUDO

A Figura 10 representa as áreas do presente estudo nos estados de Pernambuco e Paraíba, onde são identificados os pontos de coleta da região.



Fonte: O Autor (2020).

Os pontos de coleta no estado de Pernambuco estão localizados na Província Borborema, numa área densamente habitada no município de Abreu e Lima (Figura 10) com aproximadamente 100.000 habitantes, sendo cerca de 87,3% situado na zona urbana e 12,7% na zona rural. Nessa região, encontram-se casas, pequenas propriedades destinadas à agricultura familiar como única fonte de renda e sobrevivência de muitos moradores, indústrias, comércio, turismo cultural e exploração de água mineral de aquíferos (CPRM, 2005). A área no estado da Paraíba (Figura 10) utilizada neste estudo está localizada na Província da Borborema, no município de São José do Sabugi (4.010 habitantes), localizado no sertão, onde aproximadamente 56% reside na área urbana e 44% em área rural. As principais atividades econômicas nesses territórios são: agropecuária, agricultura e comércio.

Quanto aos aspectos fisiográficos, o clima do município de Abreu e Lima é tropical chuvoso com verão seco. Sua vegetação original é a mata atlântica composta por florestas sub-perenifólias que se encontram reduzidas a menos de 20 hectares, sendo as áreas ocupadas por edificações. O relevo predominante nesse município é o dos Tabuleiros Costeiros onde acompanha todo o litoral do nordeste e apresenta altitude média de 50 a 100 metros (CPRM, 2005). O clima do município de São José do Sabugi é semiárido, quente, com chuvas de verão. A vegetação é do tipo Caatinga-Seridó, composta por arbustos e árvores baixas, ralas e de xerofitismo acentuado com temperatura média anual de 27 °C. Seu relevo apresenta-se como ondulado à fortemente ondulado nas porções sudoeste (Serra da Cabaca), sudeste (Serra dos Quintos), leste (Serra do Brejinho). Nas porções noroeste e oeste, o relevo apresenta-se ondulado a suavemente ondulado, onde a declividade é média a baixa (CPRM, 2005).

Quanto a hidrografia, o município de Abreu e Lima tem seus recursos hídricos formados por fontes superficiais e subterrâneas. A superficial é inserida nos domínios das Sub-bacias hidrográficas dos Rios Catucá, Pilão, Bonança, Utinga e do Barro Branco, sendo seus cursos d'água de maioria perenes. A subterrânea está inserida no domínio hidro geológico Instersticial (rochas sedimentares da formação Beberibe, grupo Barreiras, depósitos fluviomarinhas, depósitos aluvionares), domínio Karstico-fissural (Calcários da formação Gramame), domínio Fissural (rochas de embasamento cristalino). Quanto ao abastecimento, dos 22.622 domicílios particulares permanentes, 89,2% são abastecidos pela rede geral de água, 7,4% são atendidos por poços ou fontes naturais e o restante por outras formas de abastecimento (CPRM, 2005). Com relação à São José do Sabugi, o município encontra-se inserido nos domínios da bacia hidrográfica do Rio Piranhas, sub-bacia do Rio Seridó. Seus principais afluentes são os rios São José e Santana, além dos riachos da Serra, Verde, Santa Maria, Mofumbo, Coqueirãozinho, da Serra, Poço de Pedra, Cabaça e Papa Mel, que juntos

são responsáveis pelo abastecimento humano da região. Seus cursos d'água possuem um regime de escoamento intermitente (CPRM, 2005).

3.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A coleta das amostras de água foi realizada a partir de 5 poços artesianos, sendo 2 localizados em Pernambuco, no município de Abreu e Lima e 3 na Paraíba, no município de São José do Sabugi, com suas respectivas coordenadas na tabela 4 a seguir:

Tabela 4 – Coordenadas dos pontos de coleta

Estados	Pontos	Coordenadas (Graus decimais)
Pernambuco	AL ₁	-7.892852, -34.895624
	AL ₂	-7.893888, -34.892851
Paraíba	SJS ₁	-6.783630, -36.791408
	SJS ₂	-6.830589, -36.834868
	SJS ₃	-6.784577, -36.790780

AL: Abreu e Lima, SJS: São José do Sabugi
Fonte: O Autor (2020).

Em cada poço foram coletados 800 mL de água em recipientes de vidro, previamente descontaminados com HNO₃ a 1M, identificados e devidamente protegidos, sendo 6 (seis) recipientes conduzidos ao Laboratório de Genética do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão na UFPE (CAV - UFPE) para serem utilizadas nos bioensaios e 6 (seis) recipientes que foram levados para o laboratório do Serviço de Monitoração Ambiental do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (SEAMB/CRCN-NE) para análise de metais traços. Para a amostra controle, o branco do campo, foi utilizada água destilada, obtida do laboratório do SEAMB - CRCN e levada ao campo de modo a simular possíveis contaminações nas amostras.

Foi preparado o coquetel cintilador, composto por 1L de p-xileno, 7 g de 2,5 difeniloxazol (PPO) e 0,75 g de 1,4 bis [2-(5-difeniloxazol)] - benzeno (POPOP), no laboratório do SEAMB/CRCN-NE. Em seguida, foram transferidos 12,0 mL deste coquetel para recipientes de vidro com capacidade para 25 mL, apropriados para análise por CLUBR. Durante a adição de 12 mL das amostras das águas dos poços nos recipientes com o coquetel cintilador, foi evitado ao máximo turbulências, pelo fato do ²²²Rn apresentar alto poder de emanção (HAZIN, 1990). As amostras foram conduzidas ao SEAMB/CRCN-NE para

análise radiométrica.

Para o branco analítico, foram preparados em laboratório frascos de vidro da mesma natureza daqueles utilizados para as amostras, adicionando 12 mL de água destilada e 12 mL do coquetel de cintilação, que seguiram para o campo.

Outros parâmetros físicos como temperatura e pH também foram analisados no ato da coleta.

3.3 DETERMINAÇÃO DO ^{222}Rn E DO ^{226}Ra

Para a determinação da atividade do radônio em água, foi utilizada a técnica de Cintilação Líquida de Ultrabaixa Radiação de Fundo (CLUBR) e o método de análise desenvolvido por Prichard; Gesell (1977).

A análise foi realizada após um tempo mínimo de três horas após a coleta, tempo necessário para que o ^{222}Rn entre em equilíbrio com seus radionuclídeos descendentes emissores alfas (^{214}Po e ^{218}Po).

Para a diferenciação dos espectros provenientes das partículas alfa e beta foi utilizada a ferramenta de discriminação de pulsos (PSA), cujo valor foi fixado em 90, segundo procedimento de Santos (2010). A qualidade do procedimento analítico para determinar ^{222}Rn em água foi avaliada utilizando padrões internos de ^{226}Ra do Programa Nacional de Intercomparação de Resultados de Análise de Amostras Ambientais para Determinação de Radionuclídeos do Instituto de Radioproteção e Dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear (PNI - IRD/CNEN), disponibilizados pelo SEAMB/CRCN-NE. Foram utilizados padrões com concentrações de atividade de ^{226}Ra diferentes, preparados e analisados de forma análoga à análise de ^{222}Rn das amostras.

A determinação da eficiência de contagem (E) do Espectrômetro de Cintilação Líquida (LSC) foi realizada a partir da solução padrão produzida e fornecida pelo Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD), diluída na proporção 1:8, cuja concentração de atividade de ^{226}Ra foi de $1,445 \text{ Bq L}^{-1}$ (data de referência: 02/10/14). Para isso, foram preparadas, em frascos de vidro, três amostras da solução padrão contendo 12 mL cada e 12 mL do coquetel cintilador. Foram determinadas as atividades de radônio nas soluções utilizando procedimento analítico análogo ao das amostras.

A eficiência de contagem foi calculada utilizando os resultados obtidos após 28 dias da preparação da solução padrão, quando o ^{222}Rn da amostra, atingir a condição de equilíbrio secular com o ^{226}Ra , utilizando a Equação 1.

$$E = \frac{R_A - R_B}{60 \times V \times A \times e^{-\lambda t} \times 3} \quad (1)$$

Nesta equação, R_A representa a taxa de contagem da amostra (cpm); R_B a taxa de contagem do branco analítico (cpm); 60 o fator de conversão de cpm para cps; 3 o fator de conversão para emissores alfa presentes na amostra (^{222}Rn , ^{218}Po e ^{214}Po); V o volume da amostra; A a atividade da solução padrão de ^{226}Ra ; λ a constante de desintegração do ^{222}Rn (min^{-1}) e t o tempo entre a coleta da amostra e a metade do tempo de contagem (min).

A leitura das amostras foi realizada por meio do Espectrômetro de Cintilação Líquida (LSC) produzido pela PerkinElmer, modelo Quantulus 1220, do Laboratório de Cintilação Líquida do CRCN-NE. As medidas foram realizadas em duplicata, com o tempo de contagem padronizado em 100 minutos para cada amostra. O limite de detecção do equipamento foi calculado em $0,2 \text{ Bq L}^{-1}$.

As concentrações de atividade de ^{222}Rn nas amostras foram calculadas a partir da Equação 2, de acordo com a ASTM (1998), onde E representa a eficiência de contagem.

$$A = \frac{R_A - R_B}{60 \times V \times E \times e^{-\lambda t} \times 3} \quad (2)$$

Após determinar a atividade do radônio, as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente (24°C) e protegidas da luz por no mínimo 21 dias, ou seja, até que o radônio atingisse o equilíbrio secular com o seu precursor (^{226}Ra). Em seguida foi possível determinar a concentração de atividade do ^{226}Ra nas amostras. O procedimento analítico foi idêntico ao do ^{222}Rn e a concentração de atividade do ^{226}Ra foi calculada segundo a Equação 3, cujas grandezas são semelhantes aquelas descritas para a Equação 2.

$$A = \frac{R_A - R_{BG}}{60 \times V \times E \times 3} \quad (3)$$

Vale ressaltar que o tempo não é utilizado uma vez que a constante de desintegração do ^{226}Ra é muito pequena, sendo $e^{-\lambda t} = 1$.

A qualidade do procedimento analítico para determinar ^{222}Rn em água foi avaliada utilizando padrões internos de ^{226}Ra citado anteriormente, com concentrações de atividade diferentes, preparados e analisados de forma análoga à análise de ^{222}Rn das amostras e logo após, calculado o Número En, conforme a equação 4.

$$En = \frac{V_{obt} - V_{ref}}{\sqrt{U^2_{obt} - U^2_{ref}}} \quad (4)$$

Onde:

V_{obt} representa o valor obtido experimentalmente; V_{ref} o valor certificado para o material de referência; U_{obt} a incerteza expandida em nível de 95% de confiança do valor obtido e; U_{ref} a incerteza expandida em nível de 95% de confiança do valor do certificado para o material de referência.

3.4 ANÁLISE DOS METAIS TRAÇOS

Para a determinação dos metais presentes nas águas dos poços estudados, as amostras foram colocadas em recipientes de vidro, previamente descontaminados com HNO_3 a 1M e lavados com água destilada. Após a coleta, as amostras foram acidificadas com 1 mL de HCl a 37% e mantidas a temperatura ambiente até o momento da análise no Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) modelo NexION 300 da PerkinElmer. O limite de detecção utilizado variou de 0,10 a 0,39 $\mu\text{g/L}$ para os elementos Molibdênio, Cádmiio, Antimônio, Chumbo, Tório e Urânio (INMETRO, 2011). As análises das amostras foram realizadas em duplicata

Para a otimização das condições operacionais do ICP-MS foi utilizada uma solução contendo 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Be, Ce, Fe, In, Li, Mg, Pb e U com a finalidade de definir os parâmetros de potência de fluxo do gás de nebulização, fluxo do gás auxiliar, fluxo do gás refrigerante, temperatura de resfriamento, temperatura de aquecimento, potencial de viés do quadrupolo e voltagem do multiplicador. Simultaneamente, o equipamento realizou automaticamente a verificação da razão CeO/Ce, cujo valor não ultrapassou 2,5%. O equipamento foi calibrado empregando-se curvas analíticas elaboradas com solução-padrão (Merck®) multielementar de ETR.

3.4.1 Análise dos Resultados

Primeiramente foram construídas curvas analíticas das soluções padrões obtidas para posterior análise das amostras de água de poço. Através da aplicação de ferramentas estatísticas, as incertezas analíticas foram determinadas, bem como, a comprovação da qualidade do procedimento analítico por meio do Z-score.

3.4.1.1 Incerteza analítica

Para a estimativa da incerteza analítica, foram combinados as incertezas individuais relativas à precisão (repetições analíticas), a exatidão (desvio com relação aos materiais de referência analisados) e o desvio padrão das amostras (referentes às replicatas analíticas) conforme o EURACHEM / CITAC Guide CG (ELLISON; WILLIAMS, 2012). As incertezas analíticas foram expandidas em nível de 95% de confiança.

3.4.1.2 Qualidade do procedimento analítico

Para testar a qualidade do procedimento analítico foi utilizado o Z-score que, no presente estudo, foi obtido pela diferença entre o valor observado da média das soluções padrões recém preparadas (V_{obs}) e o valor para o material de referência (V_{Ref}) que foi resultado da curva analítica formada na análise das amostras, dividido pela incerteza analítica do valor de referência (I_{Ref}), de acordo com a Equação 5.

$$Z = \frac{V_{obs} - V_{Ref}}{I_{Ref}} \quad (5)$$

O cálculo do Z-score confirma a qualidade do procedimento analítico através de valores entre -2 e 2, indicando a confiabilidade do método empregado de acordo com a norma internacional ISO 13528/2005 (MATOS; RODRIGUES, 2013).

3.5 BIOENSAIO

Para análise dos efeitos biológicos das águas dos poços estudados foram utilizados insetos da espécie *D. melanogaster* e o ensaio cometa, detalhes são apresentados nos subtópicos a seguir.

3.5.1 Criação de *Drosophila melanogaster*

Os insetos foram coletados em áreas não radioativa no estado de Oregon, Estados Unidos e mantidos em cultura de massa sob condições laboratoriais controladas. A partir desse cultivo, foram utilizadas larvas com 72 horas de vida da espécie *Drosophila melanogaster* oriundos do insetário do Laboratório de Genética do Centro Acadêmico de Vitória da UFPE.

3.5.2 Teste de genotoxicidade

Para avaliar os efeitos biológicos da água dos poços estudados foi realizado o ensaio cometa em larvas de *D. melanogaster* que serão detalhados a seguir.

3.5.2.1 Ensaio cometa em *Drosophila melanogaster*

Foram utilizadas células da hemolinfa (hemócitos) de larvas de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R, mantidas há várias gerações em condições de endocruzamento e cultivo em laboratório. Para o ensaio cometa foram utilizadas larvas com 72 ± 4 horas de vida (3º estágio), 60 larvas para cada amostra de água de poço. As larvas foram transferidas para o meio de tratamento composto por purê de batata desidratado, acrescido de 3 mL da amostra da água de poços das regiões estudadas por 24h. Foram utilizados dois controles: o negativo, tratado apenas com água destilada, e o positivo, tratado com 3 mL de ciclofosfamida a 1mg/mL. A ciclofosfamida é um potente agente genotóxico pelo fato de causar quebras de DNA de uma ou duas vertentes, dimerização da base, formação de locaisapurínicos ou apirimidínicos, e outros tipos de danos genéticos (SHARMA et al., 2011). Após a exposição foi realizado o ensaio do cometa segundo a metodologia desenvolvida por Carmona et al. (2011b) e Verçosa (2015a), descrito no próximo subitem.

3.5.2.2 Extração da hemolinfa

Os hemócitos foram extraídos de 60 larvas, que constituíram uma réplica do experimento. Em cada amostra de água de poço, três réplicas foram submetidas ao teste, totalizando um pool de hemócitos de 180 larvas, para cada local de coleta. De cada réplica, 60 larvas foram colocadas em uma placa de Petri e, em seguida, foram levadas ao freezer para resfriamento a 4°C por um minuto, para diminuir a taxa metabólica facilitando, assim, sua manipulação. Passado o tempo previsto, as larvas foram, individualmente, transferidas para um poço de uma placa escavada Kline (12 poços), contendo solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), evitando a coagulação da hemolinfa. Para a retirada da hemolinfa, as larvas foram cortadas lateralmente com a ajuda de um bisturi (utilizado para procedimentos cirúrgicos), uma pinça de relojoeiro nº 5 e um microscópio estereoscópico (lupa).

Através de uma micropipeta, a hemolinfa depositada na placa Kline foi coletada e transferida para um microtubo de 1,5 mL. O tubo, contendo a solução de EDTA+hemolinfa foi centrifugado duas vezes a 3.000 rpm por 3 minutos, e descartado 100 µL do sobrenadante. Para completar o volume do tubo foi acrescido mais 100 µL de EDTA e submetida a uma nova centrifugação.

3.5.2.3 Preparação das soluções

Para a realização do ensaio foi preparada previamente algumas soluções estoque: gel de agarose de baixo ponto de fusão (LM); gel de agarose padrão; solução de 150 µL EDTA; solução de NaOH; tampão fosfato alcalino (PBS). Outras soluções foram preparadas no momento do teste, como: solução de lise, ajustada para pH 10, contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1M NaOH, 10mM Tris, 1% Triton X-100, e 10% DMSO, e o tampão de eletroforese, ajustado para pH > 13, possuindo NaOH a 1M, 200 mM EDTA.

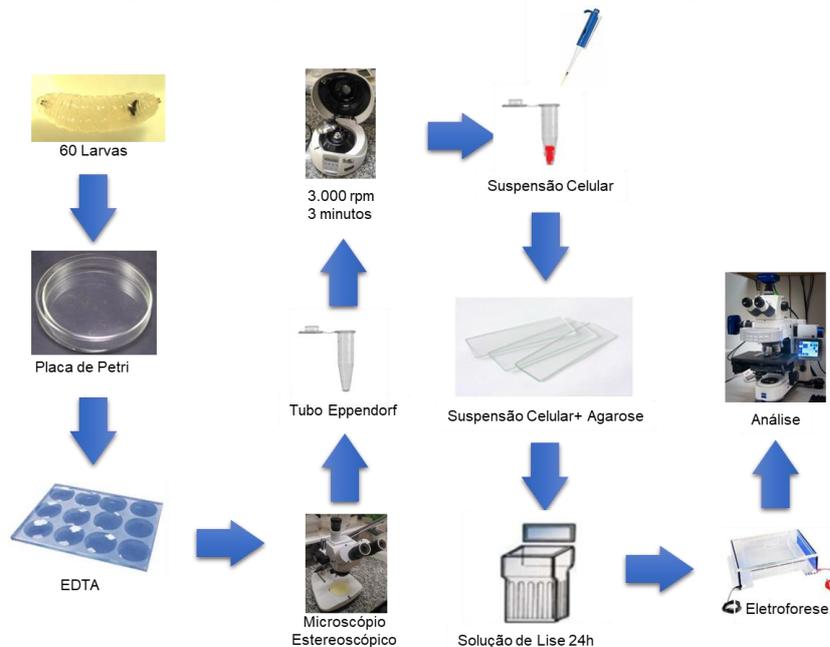
3.5.2.4 Montagem das lâminas

Lâminas histológicas foram previamente lixadas na face superior para facilitar a adesão da agarose. Em seguida, foram lavadas com água, detergente e posteriormente imersas em álcool a 70% e na sequência, colocadas para secar. Após a coleta de 60 µL da suspensão da hemolinfa das larvas de *D. melanogaster*, o material foi homogeneizado em 100 µL de solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C. A etapa foi realizada na ausência de luz por ser fotossensível. O homogeneizado foi aplicado em lâminas previamente banhadas

em agarose padrão e, em seguida, uma lamínula (24 mm x 60 mm) foi colocada sobre o material. Para solidificar a agarose, as lâminas foram submetidas a 4°C por 10 minutos. Passado esse tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas, com o material biológico, foram imersas em solução de lise e mantidas a 4°C por 72h.

Ao término da lise celular, as lâminas foram submetidas por 20 minutos a uma solução tampão a 4°C a fim de desnaturar o material genético. Em seguida foi realizada a corrida de eletroforese por 20 minutos a 40 V/cm e 300 mA. Ao final da corrida, as lâminas foram recolhidas e postas em uma solução de neutralização (Tris-HCl a 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos. Logo após, as lâminas foram fixadas, sendo imersas em etanol absoluto por 5 minutos, e armazenadas a 4°C até o momento da análise microscópica. O esquema do teste de genotoxicidade foi resumido na Figura 11.

Figura 11 – Esquema do ensaio cometa em *D. melanogaster*



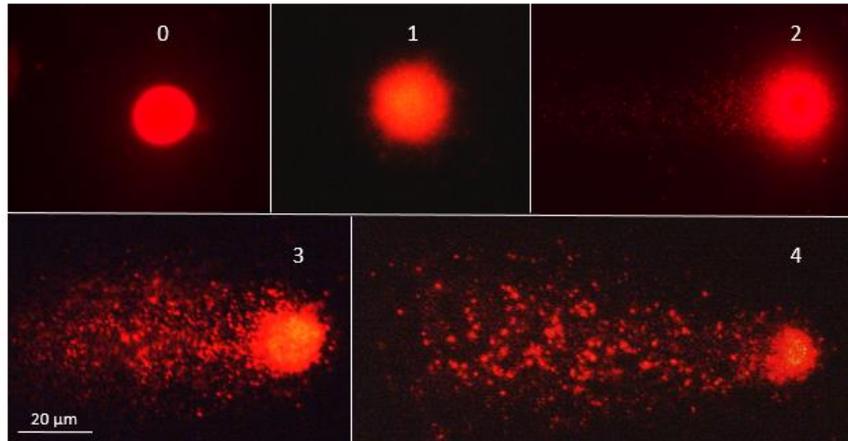
Fonte: O Autor (2020).

3.5.2.5 Análise microscópica

O dano do DNA foi quantificado após as lâminas serem coradas com 50 µL de uma solução GelRedTM (diluído na proporção 1:500 em água destilada), utilizando um microscópio de fluorescência (Zeiss Imager, M2), disponibilizado pelo Laboratório de Biodiversidade do CAV - UFPE, equipado com um filtro (Alexa Fluor 546) a 400x de ampliação. No total, foram utilizados 100 nucleóides para cada repetição, sendo 50 em cada lâmina e analisadas em triplicata.

A inspeção visual foi realizada conforme descrito em Collins et al. (2008), e os nucleóides foram classificados em cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4), dependendo da extensão das caudas de cometa (Figura 12).

Figura 12 – Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético



Fonte: Verçosa (2017).

*Imagem obtida de hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* coradas por Gel Red™

A classe 0 indica cometas não danificados (0), enquanto as classes 1 a 4 corresponderam aos danos em níveis crescentes no material genético. Os cometas foram avaliados por meio do Índice de Danos (ID) e Frequência de Danos (FD%), segundo Verçosa (2017), sendo os valores do ID que foram obtidos, para cada indivíduo, variaram de 0 a 400 (Célula intacta: 100 células x 0; e dano máximo: 100 células x 4, respectivamente). Assim, o índice de dano foi calculado por meio da Equação 6, sendo n o número de cometas quanto à classe.

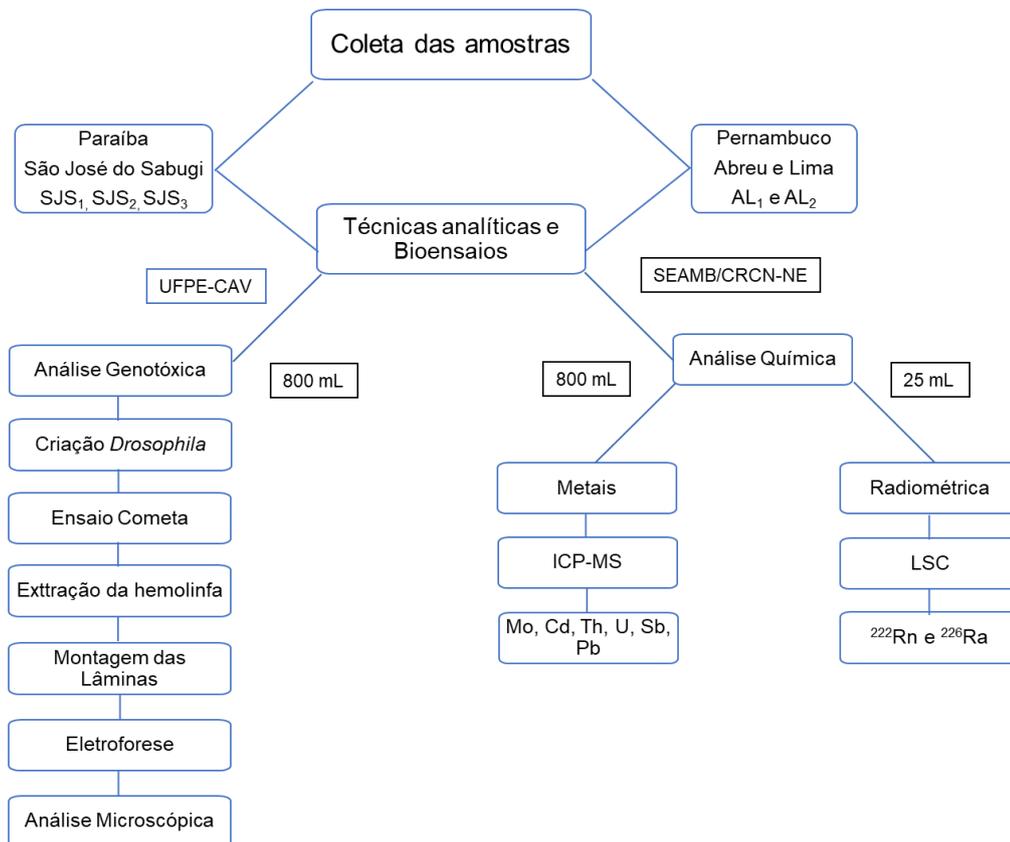
$$ID = 0.(n_0) + 1.(n_1) + 2.(n_2) + 3.(n_3) + 4.(n_4) \quad (6)$$

O segundo parâmetro, que é a frequência de danos, FD (%), foi calculado como a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 1 a classe 4) em relação ao total de cometas contados (N_T), como apresentado na Equação 7. N_0 é o número de Classe 0.

$$FD (\%) = \frac{[(N_T - N_0).100]}{N_T} \quad (7)$$

Para uma melhor compreensão, as etapas de toda a metodologia foram resumidas no fluxograma da Figura 13 a seguir.

Figura 13 - Fluxograma das etapas realizadas na pesquisa



Fonte: O Autor (2020).

SJS: São José do Sabugi; AL: Abreu e Lima; ICP-MS: Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado; LSC: Espectrômetro de Cintilação Líquida.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os grupos controles e exposição de ocorrência NORM foram realizadas por meio da Análise de Variância (ANOVA) e do teste post-hoc de Bonferroni, usado para comparar as médias das réplicas para o ID e a FD. A associação entre os elementos químicos essenciais analisados nas águas de poços e a genotoxicidade da *Drosophila melanogaster* foi realizada pela análise de agrupamento utilizando o programa STATISTICA versão 10. As diferenças estatísticas foram aceitas quando $p \leq 0,05$, utilizando o software STATA versão 12.

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nesta seção, são apresentados os resultados obtidos das análises físico-química, bem como das análises radiométricas e dos valores encontrados das concentrações de metais pesados nas amostras estudadas. Serão retratados os procedimentos para garantia da qualidade dos processos analíticos das técnicas utilizadas e a aplicação de *D. melanogaster* como bioindicador de efeitos genotóxicos das águas de poços de regiões ricas em fosforito uranífero. Para finalizar será apresentado uma análise de agrupamento entre os elementos químicos presentes na água de poços e os efeitos genotóxicos apresentados pelas larvas de *Drosophilas*.

4.1 QUALIDADE DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO

A qualidade do procedimento analítico é fundamental para estudos de monitoração ambiental. Por isso, foram verificadas as metodologias de análise radiométrica e de elementos traços utilizados na avaliação de águas de poços sob influência NORM. Os valores obtidos empiricamente e de referência, que foram utilizados no controle da qualidade do procedimento analítico da determinação de ^{222}Rn e ^{226}Ra foram apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Controle da qualidade do procedimento analítico para a determinação de ^{222}Rn e ^{226}Ra em água

Data de referência	Amostras	Concentração de atividade* de ^{226}Ra em equilíbrio com ^{222}Rn (Bq L ⁻¹)		Número En
		Valor Obtido	Valor de Referência	
16/01/2017	1	1,14 ± 0,3		-0,67
	2	1,13 ± 0,3	1,40 ± 0,21	-0,71
	3	1,14 ± 0,3		-0,68
12/06/2017	1	0,61 ± 0,3		-0,09
	2	0,60 ± 0,3	0,64 ± 0,10	-0,12
	3	0,61 ± 0,3		-0,08

Fonte: O Autor (2020).

*Média ± incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança.

Para garantir a qualidade do procedimento analítico, é preciso que o Número En calculado encontre-se entre -1 e 1 (ISO, 2005). Portanto, uma vez que os valores encontrados

variaram entre -0,08 e -0,71, garantem a qualidade do procedimento analítico utilizado para as determinações desses radionuclídeos em água por Espectrometria de Cintilação Líquida realizadas neste estudo.

Para realização da medida dos metais nas amostras de água dos poços foi realizado primariamente o teste de qualidade do procedimento analítico. Os valores de referência das amostras, bem como, o Z-Score são detalhados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de referência do controle da qualidade do procedimento analítico de metais em água

Elementos	Valor Obtido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Valor de Referência ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Z-Score
Urânio	6,70	$6,34 \pm 0,21$	1,7
Tório	6,86	$6,66 \pm 0,24$	0,8
Chumbo	6,37	$6,37 \pm 0,15$	0,0
Cádmio	6,67	$6,38 \pm 0,17$	1,7
Antimônio	6,68	$6,42 \pm 0,16$	1,7
Molibdênio	7,08	$6,46 \pm 0,21$	1,4

Fonte: O Autor (2020).

Os valores do Z-Score de todos os elementos apresentados na Tabela 6 estão entre -2 a 2, variando entre 0 e 1,7 garantindo a qualidade do procedimento analítico, em nível de 95% de confiança (ISO 13528/2005).

4.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Os resultados da análise físico-química estão representados na Tabela 7 a seguir, onde se observa os valores de temperatura e pH nas amostras de água de poços dos municípios em estudo.

Tabela 7 – Parâmetros físico-químicos encontrados

Pontos	pH	Temperatura (°C)
AL ₁	5,20	26,0
AL ₂	6,05	25,0
SJS ₁	7,55	29,9
SJS ₂	6,80	30,1
SJS ₃	7,08	29,2

Fonte: O Autor (2020).

O pH das amostras analisadas variaram entre 5,20 e 7,55 e esse parâmetro pode influenciar tanto no equilíbrio geoquímico, quanto na solubilidade de muitas espécies, abrangendo elementos traços na água subterrânea. Além disso, o pH acima de 7 promove precipitação de hidróxido, diminuindo a mobilidade dos metais associados na água (CHAKRABARTI et al., 2011).

Outro ponto a ser destacado, refere-se aos valores do pH que estão dentro do limite máximo permitido pela Portaria nº 5/17 do Ministério da Saúde, na qual determina valores entre 6 e 9,5 como sendo considerados adequados ao consumo humano, exceto o poço AL₁ que apresentou valor de 5,20.

Quanto a temperatura, as águas de poços apresentaram valores entre 25 e 30,1 e podem ser classificadas, segundo a convenção de Custódio e Llamas (1996) em: hipotermal <25°C; mesotermal > 25°C e < 35°C; termal > 35°C e <45°C; hipertermal > 45°C. Desta forma, todas as amostras analisadas são consideradas mesotermal.

4.3 ANÁLISE RADIOMÉTRICA DA ÁGUA

Os resultados da análise das concentrações de ²²²Rn e ²²⁶Ra nas amostras de água dos poços obtidas nos municípios de Abreu e Lima-PE e São José do Sabugi-PB utilizando a técnica de CLUBR são apresentados na Tabela 8. Os dados atribuídos à referida tabela foram apresentados em função das médias amostrais com base na avaliação em duplicata.

Tabela 8 – Concentrações específicas médias de ^{222}Rn e ^{226}Ra nas águas de poços dos estados de Pernambuco e Paraíba

Estado	Poços	^{222}Rn (Bq L ⁻¹)	^{226}Ra (Bq L ⁻¹)
		Media ± u	Media ± u
Pernambuco	AL ₁	79,0 ± 1,4	<1
	AL ₂	206,0 ± 2,5	<1
	SJS ₁	263,8 ± 8,3	<1
Paraíba	SJS ₂	1.107,0 ± 28,6	<1
	SJS ₃	352,2 ± 10,4	<1

AL: Abreu e Lima; SJS: São José do Sabugi; u: Incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança.

Fonte: O Autor (2020).

A técnica do CLUBR com o uso do espectrômetro de cintilação líquida confirmou a presença desses radionuclídeos nas amostras de água dos poços dos dois municípios. Dados semelhante foram encontrados por Amaral (2018) e Silva (2018), que também avaliaram amostras de água de poços nos Municípios de Abreu e Lima e São José do Sabugi, respectivamente, áreas com alta radioatividade natural, onde se observou a presença de radônio acima do valor máximo permitido (11,1 Bq L⁻¹) segundo a USEPA (1999). As altas concentrações obtidas para ^{222}Rn nas amostras de água dos poços de Abreu e Lima pode ser explicada pela existência do fosfato uranífero da região (AMARAL, 1994).

Com relação ao ^{226}Ra , todas as amostras analisadas de Abreu e Lima e São José do Sabugi apresentaram concentração específicas abaixo do valor mínimo detectável pelo equipamento (< 1,0 Bq L⁻¹), não ultrapassando o valor permitido para consumo humano (1,0 Bq L⁻¹) (BRASIL, 2017). De fato, os resultados permitem estabelecer padrão de monitoração continuada do radônio nos poços estudados, assim como, controle das atividades desenvolvidas nessas áreas.

4.4 ANÁLISE DE METAIS TRAÇOS

Na Tabela 9 pode-se observar o resultado das concentrações dos metais traços trabalhados nessa pesquisa para amostras de água de poços de Abreu e Lima/PE e São José do

Sabugi/PB, bem como, incertezas expandidas em nível confiança de 95%. Os valores encontrados foram determinados baseando-se nos limites de detecção para cada elemento.

Tabela 9 – Concentrações médias de metais pesados nas águas de poços em áreas de Pernambuco e Paraíba

POÇOS	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	U	Th	Pb	Cd	Sb	Mo
AL₁	4,16 ± 0,85	<0,32	<0,39	<0,22	<0,21	0,12 ± 0,03
AL₂	1,17 ± 0,25	<0,32	<0,39	<0,22	<0,21	<0,10
SJS₁	116 ± 24	<0,32	<0,39	<0,22	<0,21	30 ± 6
SJS₂	447 ± 91	<0,32	<0,39	<0,22	<0,21	17 ± 4
SJS₃	700 ± 142	<0,32	<0,39	<0,22	<0,21	16 ± 3

Fonte: O Autor (2020).

AL: Abreu e Lima; SJS: São José do Sabugi.

De acordo com a Portaria de Consolidação nº 5/17 do Ministério da Saúde, o valor máximo permitido em águas utilizadas para consumo humano para o urânio é de $30 \mu\text{g L}^{-1}$. (BRASIL, 2017). Como apresentado na Tabela 9, para o U foram obtidos resultados de 116, 447 e $700 \mu\text{g L}^{-1}$, todos no município de São José do Sabugi na Paraíba, ressaltando a água do poço SJS₃, que apresentou valor cerca de 23 vezes maior que o permitido pelo ministério da saúde do Brasil.

Estudos realizados por Bonotto (2008), afirmam que a concentração de urânio em águas subterrâneas varia de acordo com as rochas presentes na formação do solo, onde valores acima de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ são considerados anômalos. Portanto, todos os dados encontrados no município de São José do Sabugi recebem esta classificação.

No município de Abreu e Lima, no estado de Pernambuco, as concentrações de urânio estão abaixo de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$, porém, mesmo que os resultados apontem para valores abaixo do recomendado pelo Ministério da saúde, as águas dos poços precisam ser estudadas continuamente, uma garantia do controle de qualidade e segurança radiométrica, tendo em vista o histórico de ocorrências radioativas naturais vinculados à região.

Trabalhos realizados em outros países mostram preocupação para níveis de urânio em águas subterrâneas quando na faixa entre $0,016$ a $3,01 \mu\text{g L}^{-1}$, representando risco médio a saúde humana (PLUM et al.; 2009; LIESCH et al., 2015). Estas informações reforçam o interesse deste trabalho em avaliar possíveis efeitos genotóxicos ao sistema biológico de organismos naturalmente expostos a diferentes concentrações de urânio, como acontece em São José do Sabugi e Abreu e Lima.

Pesquisa realizada por Wu et al (2014), na região do norte da China determinou que as concentrações de urânio em águas subterrâneas variaram de 0,02 a 288 $\mu\text{g L}^{-1}$, com média de 24 $\mu\text{g L}^{-1}$. A alta concentração foi associada a constituição do solo com presença de rochas sedimentares carboníferas. Portanto, esta informação ajuda a entender os resultados encontrados neste trabalho, onde pesquisa realizada por Amaral (2018) desenvolvida no município de Abreu e Lima identificou que a região uranífera é formada por rochas sedimentares, carboníferas que possuem maiores teores de urânio. Estudos realizados por Auvinen et al. (2002), investigando diferentes poços na Finlândia, determinaram as concentrações de urânio e os resultados indicaram que os maiores níveis desse elemento foram encontrados em águas de poços influenciadas por rochas graníticas, agregado sólidos também observados em São José do Sabugi e segundo estudos de Silva (2018), pode estar relacionado com os altos índices desse elemento.

No que se refere ao tório, não há valor máximo estabelecido para esse elemento segundo a Portaria de Consolidação nº5/17. Além disso, foram encontrados valores abaixo do limite de detecção do ICP-MS para esse metal ($<0,32 \mu\text{g L}^{-1}$), como mencionado na Tabela 9, mas isso não indica a sua ausência na água. Essa circunstância pode ser explicada em consequência da sua baixa solubilidade com o corpo hídrico, comportando a sua forma suspensa em coloide, o que pode dificultar a quantificação desse radionuclídeo (LANGMUIR & HERMAN, 1980; FERRONSKY & POLYAKOV, 1982).

Na Tabela 9, a concentração do chumbo está abaixo do limite de detecção do equipamento ($<0,39 \mu\text{g L}^{-1}$) para todas as amostras de água de poços analisadas. Sugere-se que estes baixos valores encontrados são devido ao chumbo ficar retido nos sedimentos, diminuindo o seu transporte para as águas subterrâneas (LEMES et al, 2003). Além disso, os compostos sulfatos e carbonatos, que são formados pelo chumbo nas águas subterrâneas, possuem baixa solubilidade (FORTUNATO, 2009).

Segundo a Portaria de Consolidação nº5/17, o valor máximo permitido para o cádmio em águas subterrâneas é de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Neste trabalho os valores encontrados foram abaixo do limite de detecção do ICP-MS ($<0,22 \mu\text{g L}^{-1}$). Esse elemento está presente em grandes concentrações nas rochas sedimentares (SMITH et al., 1995), matriz semelhante presente no município de Abreu e Lima, entretanto, esses baixos níveis de cádmio podem ser explicados pela sua baixa solubilidade em água, quando a forma de carbonato ou hidróxido, permanece retido nos solos até que haja a ação do intemperismo (MCCOMISH & ONG, 1988).

O antimônio também apresentou concentração abaixo do limite de detecção do equipamento para todas as amostras analisadas ($<0,21 \mu\text{g L}^{-1}$), inferior ao limite máximo

permitido para consumo humano ($5,0 \mu\text{g L}^{-1}$), segundo a Portaria de Consolidação nº 5/17. Sugere-se que a sua baixa concentração nas águas de poços é devida a presença de elementos que diminua a sua mobilidade, como o ferro (LINTSCHINGER et al., 1998), encontrado por Amaral (2018) e Trindade (2008) nas regiões do presente estudo. Para Hammel e colaboradores (2000), o antimônio apresenta baixa solubilidade sob a forma de sulfetos, o que fez acreditar que o elemento em estudo apresente uma baixa biodisponibilidade. Portanto, a sua baixa solubilidade no solo poderia impedir a sua bioacumulação nos sistemas hídricos.

Sobre o molibdênio, não há limite máximo permitido para o consumo humano, segundo a Portaria de Consolidação nº5/17, mas foram encontradas maiores concentrações no município de São José do Sabugi (SJS₁, SJS₂, SJS₃), apresentando valores de 30; 17 e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, conforme a Tabela 9. No município de Abreu e Lima (AL₁ e AL₂) observou-se baixas concentrações, sendo a água de poço AL₂ com valores abaixo do limite de detecção do equipamento. Esse metal se apresenta enriquecido em rochas graníticas (KABATA PENDÍAS & PENDÍAS, 1984; SIEGEL, 1979), e como descrito na literatura, ocorre à presença dessas rochas no município de São José do Sabugi, o que pode explicar as concentrações encontradas (PASTURA et al, 2011). Além disso, sob a influência de rochas sedimentares, no município de Abreu e Lima, sugere-se que o molibdênio se acumule nessas rochas devido a presença de ferro, diminuindo sua quantidade nas águas subterrâneas (LANDON, 1996).

Portanto, avaliar a ação radiológica e química das amostras dessas águas sobre o sistema biológico é extremamente importante e para isso deve-se analisar os possíveis efeitos biológicos, bem como, estabelecer uma nova ferramenta para detectar tais efeitos. Diante disso, foi realizado a análise genotóxica da água dos poços utilizando o bioindicador, aceito internacionalmente, *Drosophila melanogaster* Oregon-R, que será apresentado a seguir.

4.5 BIOENSAIO: ANÁLISE GENOTÓXICA COM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A hemolinfa de larvas de *D. melanogaster* Oregon-R foi utilizada para realização do ensaio cometa e conseqüentemente avaliação do efeito biológico sobre o DNA decorrente do consumo das águas de poços artesianos. Por meio da análise dos resultados obtidos, verificou-se que o ensaio permitiu determinar a existência de danos no DNA das larvas dos insetos pelas águas subterrâneas sob influência de NORM. Estes resultados são apresentados na Tabela 10 e nas Figuras 14 e 15.

Tabela 10 – Danos genéticos em hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* Oregon-R

PARÂMETRO	NÍVEL DE DANO				
	0	1	2	3	4
C-					
Média	96,33	3,33	0	0,33	0
DP	0,58	0,58	0	0,58	0
C+					
Média	44,00	38,33	11,00	6,67	1,00
DP	3,61	2,89	1,00	0,58	0
SJS ₁					
Média	90,00	5,00	3,33	1,67	0
DP	1,00	1,00	0,58	0,58	0
SJS ₂					
Média	80,67	6,67	5,67	4,67	2,33
DP	0,58	1,15	1,53	0,58	0,58
SJS ₃					
Média	72,00	8,67	5,00	6,67	7,67
DP	2,65	0,58	1,73	1,15	1,53
C-					
Média	84,33	14,00	1,67	0	0
DP	2,08	1,00	1,15	0	0
AL ₁					
Média	54,67	37,67	5,00	1,33	0
DP	2,08	0,58	2,65	0,58	0
AL ₂					
Média	88,00	11,67	1,00	0	0
DP	0	0,58	0	0	0

Fonte: O Autor (2020).

C-: Controle Negativo (água destilada); C+: Controle Positivo (ciclofosfamida) DP: Desvio Padrão; SJS: São José do Sabugi, AL: Abreu e Lima.

Durante a análise das lâminas foram observados diferentes níveis de danos no DNA dos hemócitos das larvas *D. melanogaster*, destacando-se as amostras de água dos poços do município de São José do Sabugi (SJS₂ e SJS₃) que apresentaram maiores danos ao DNA (nível 3 e 4). Nesses poços também foi constatado maiores níveis de NORM (urânio e radônio). Os resultados das amostras dos grupos SJS₁, AL₁ e AL₂ apresentaram pouco dano de nível 3 e 4, além de apresentarem altas quantidades de nucleóides pertencentes ao grau 0 (90,00, 54,67 e 88,00, respectivamente) indicando baixa genotoxicidade na água desses poços. A concentração de urânio apresentada na Tabela 9 e a atividade do radônio da Tabela 8 são menores que as encontradas para SJS₂ e SJS₃, sugerindo uma forte relação entre a presença desses elementos e a genotoxicidade em *D. melanogaster*.

Verçosa et al. (2017) estudando o efeito do radônio em áreas do Rio Grande do Norte, Brasil, por meio do ensaio cometa, também evidenciou a presença de danos 3 e 4 nos

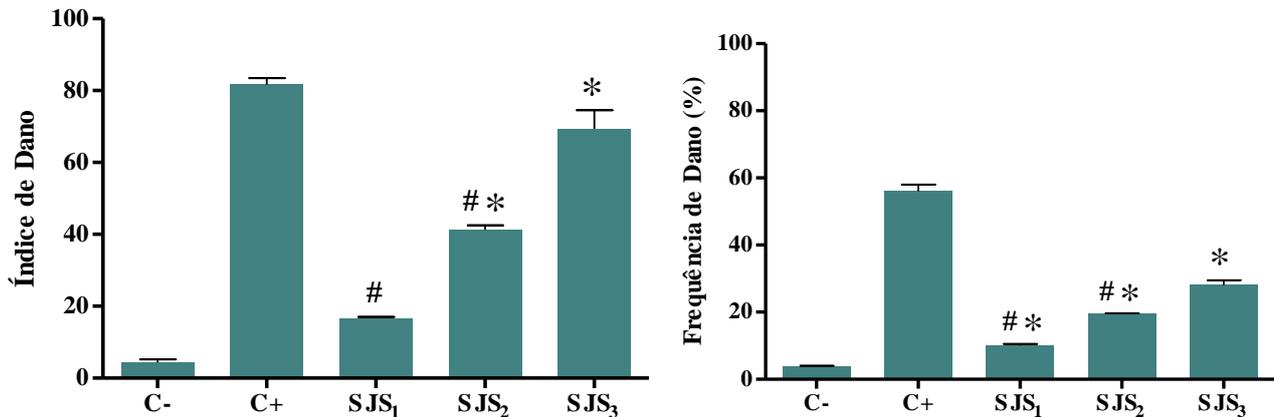
hemócitos de *Drosophila melanogaster*, indicando que o ensaio é sensível a exposição à radiação natural presente na água ou no ar. Trabalho realizado por Lourenço et al. (2010) utilizando o ensaio cometa para avaliar danos ao DNA de peixes expostos a diferentes concentrações de urânio, demonstrou que as maiores concentrações desse radionuclídeo causaram aumento de danos 3 e 4 ao DNA do animal. Estes relatos corroboram com os dados encontrados neste trabalho.

No entanto, quando se observa apenas os dados do município de Abreu e Lima em Pernambuco, os danos mais significativos apresentados foi de nível 1, dando destaque a amostra AL₁ que apresentou 37,67 de dano de nível 1 e AL₂ que foi de 11,67. Investigando as concentrações de radônio nessas amostras de água observa-se que a atividade em AL₂ (206 Bq.L⁻¹) é mais alta do que em AL₁ (79 Bq.L⁻¹), porém, a concentração de urânio nas águas destes poços foi de 4,21 µg L⁻¹ para AL₁ e de 1,22 µg L⁻¹ em AL₂. Esses resultados sugerem que os danos genotóxicos presentes em larvas de *D. melanogaster* estão diretamente relacionados com a presença de urânio na água desses poços. Dados semelhantes foram encontrados por Morais (2020) analisando as amostras de águas de poços de Abreu e Lima e São José do Sabugi utilizando como bioindicador hemolinfa do molusco *B. glabrata*.

Embora os valores da concentração de urânio encontrados nas águas de poços de AL₁ e AL₂ estejam abaixo do limite permitido em águas utilizadas para consumo humano proposto pela portaria de consolidação nº5/17, do Ministério da Saúde do Brasil, os experimentos de genotoxicidade demonstraram que essas águas causaram danos ao DNA dos insetos expostos.

Ressalta-se que o Ensaio Cometa tem sido utilizado eficazmente para detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Para isso são utilizados os cálculos do índice de dano e frequência de dano ao DNA. Na Figura 14 pode-se observar os índices e frequência de dano observados em hemócitos de *D. melanogaster* após a exposição das amostras de água de poços contendo NORM, localizados no município de São José do Sabugi, no estado da Paraíba.

Figura 14 – Índice e frequência de danos observados em hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* Oregon-R expostas às amostras de água de poços de São José do Sabugi-PB.



Fonte: O Autor (2020).

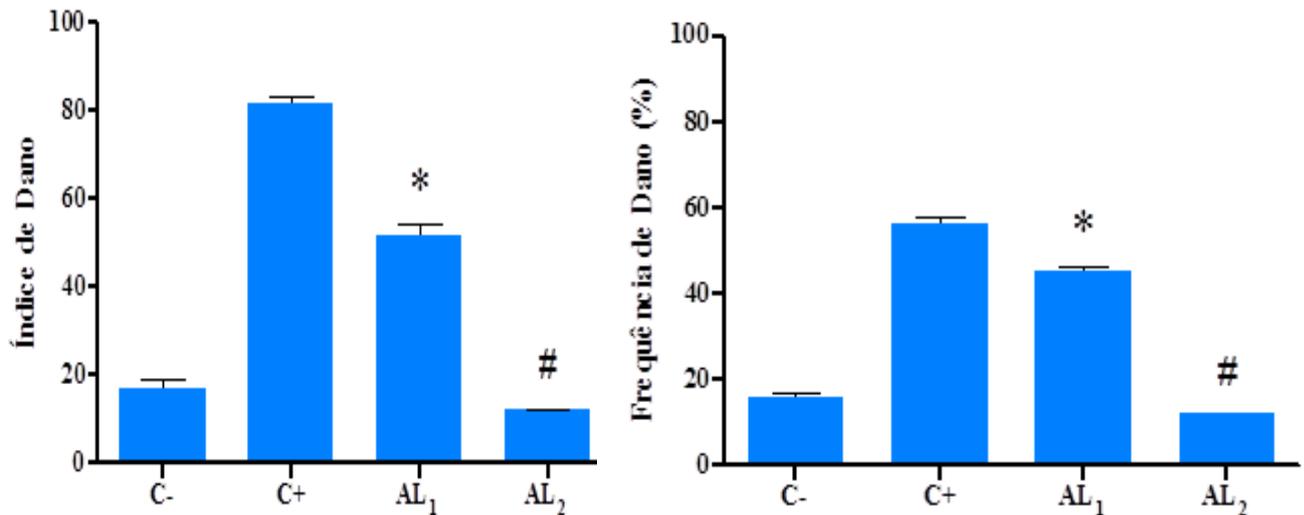
C-: Controle Negativo (água destilada); C+: Controle Positivo (ciclofosfamida); SJS: São José do Sabugi. Sendo, *: vs C- e #: vs SJS₃ diferente estatisticamente com $p \leq 0,05$.

Pode-se observar diferenças estatisticamente significativas nos índices e frequências de danos dos grupos expostos em relação ao controle negativo (água destilada), exceto no índice de dano na água de poço de SJS₁ que se apresentou com 16,67, ou seja, menor genotoxicidade comparada com as outras amostras. Logo em seguida está a amostra de SJS₂ que apresentou índice de dano de 44,33 e frequência de dano de 19,33%, sendo a segunda amostra com maior dano genotóxico. A água do poço de SJS₃ apresentou o maior índice e frequência de dano dentre as outras amostras (69,33 e 28%, respectivamente), indicando ser a amostra com maior genotoxicidade neste município.

Ao realizar comparação entre os pontos SJS₃ com os poços SJS₁, SJS₂ (representado por #), pode-se observar diferenças estatisticamente significativas entre as amostras, tanto no índice de dano quanto na frequência de dano, demonstrando alta genotoxicidade do poço SJS₃. Vale destacar que o mesmo se aproximou do valor do índice de dano do controle positivo (81,67), corroborando seu efeito genotóxicos, destacando que é preciso ter atenção no consumo dessas águas pela população residente neste local.

A Figura 15 evidencia os resultados dos índices e frequências de danos observados em hemócitos de *Drosophila melanogaster* Oregon-R expostas às águas de poços com a presença de NORM, localizadas no município de Abreu e Lima, no estado de Pernambuco.

Figura 15 – Índice e frequência de danos observados em hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* Oregon-R expostas às amostras de água de poços de Abreu e Lima-PE



Fonte: O Autor (2020).

C-: Controle Negativo (água destilada); C+: Controle Positivo (ciclofosfamida) AL: Abreu e Lima. Sendo *: AL₁ vs C- e #: AL₁ vs AL₂ diferente estatisticamente com $p \leq 0,05$.

A amostra AL₁ apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo, para o índice e frequência de danos, indicando genotoxicidade nas águas de poço, através dos hemócitos da *Drosophila melanogaster* no ensaio Cometa. A amostra AL₂, segundo os dados da Figura 15, não apresentou dano genotóxico. Além disto, pode-se ressaltar a diferença estatisticamente significativa entre as amostras AL₁ e AL₂, indicado pelo símbolo #.

Como citado anteriormente, estes danos ao DNA podem estar diretamente relacionados à presença do elemento urânio e menor influência do radônio. Carmo Neto (2019), utilizando *Drosophila melanogaster* para avaliar a contaminação de fontes de abastecimento hídrico nos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas, no Rio Grande do Norte, utilizando o ensaio cometa, demonstrou danos estatisticamente significativos nas amostras contaminadas por radiação natural. Estes achados corroboram com os dados encontrados neste trabalho, que comprovam que a *D. melanogaster* é um modelo sensível para a detecção de danos genéticos expostos as amostras de água com influência NORM.

Outros estudos, envolvendo a utilização de diferentes radiações para avaliar seus efeitos na *D. melanogaster*, demonstrou que o animal apresenta sensibilidade para a detecção de danos ao DNA, além de assegurar que o ensaio cometa, teste utilizado no presente estudo, pode ser utilizado para avaliar efeitos da radiação (CARMONA et al., 2011a; CARMONA et al., 2011b; PASHA et al., 2016).

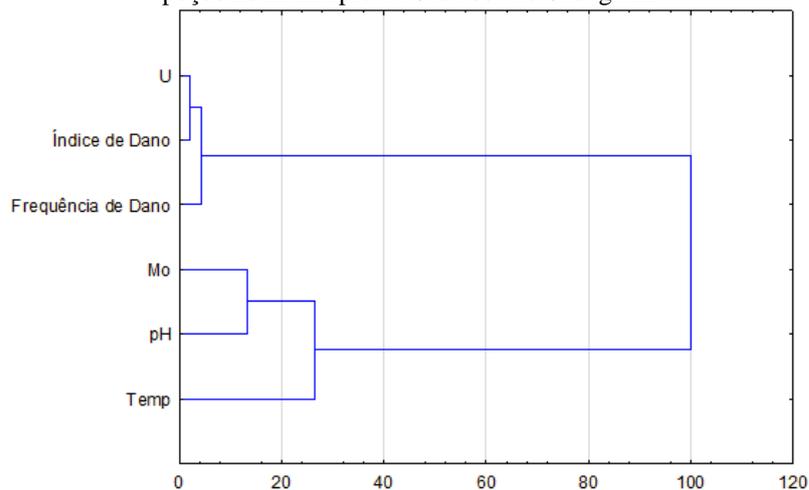
4.6 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DOS DADOS DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS E BIOENSAIOS

Neste subtópico será apresentado a análise de agrupamentos utilizando a técnica de Clustering que emprega agrupamentos de dados segundo o seu grau de semelhança. Para cada conjunto de dados, dá-se o nome de Cluster, que serão mostrados a seguir.

4.6.1 Agrupamento de dados relacionados as amostras do município de São José do Sabugi-PB

A figura 16 apresenta o dendrograma de agrupamentos de dados das amostras de água dos poços do município de São José do Sabugi-PB utilizando o método de ligação de Ward's, sendo possível relacionar os achados das técnicas analíticas dos pontos de coleta com os bioensaios. Esta análise de agrupamento leva em consideração os vetores das médias dos dados analisados, permitindo encontrar similaridades entre os resultados de um mesmo grupo ou entre eles, assim como, a distância baseada nas diferenças entre os dados dos grupos. A função distância define o grau de semelhança entre os elementos, ou seja, quanto menor a distância, maior a semelhança entre os elementos analisados.

Figura 16 – Dendrograma de agrupamentos de dados a partir da técnica de Clustering em amostras de água de poços no município de São José do Sabugi-PB



Fonte: O Autor (2020).

Conforme o dendrograma da figura 16, pode-se observar um alto grau de similaridade entre o urânio e o índice de dano em razão da baixa distância representado no primeiro cluster. Quando se observa a concentração do elemento traço presente na água dos poços, a

amostra SJS₃ apresentou a maior concentração de urânio dentre as três amostras (700 µg L⁻¹), sendo assim os efeitos genotóxicos nos hemócitos de larvas de *D. melanogaster* podem estar relacionados a presença deste elemento. Outro fato que pode ser mencionado é a relação dose-dependente entre a concentração do urânio e os danos genotóxicos das amostras de água de poço de São José do Sabugi-PB, ou seja, quando há um aumento da concentração de urânio (SJS₁ – 116 µg L⁻¹, SJS₂ – 447 µg L⁻¹, SJS₃ – 700 µg L⁻¹) observa-se um aumento no índice e frequência de danos (16,67 e 10,33%, 44,33 e 19,33%, 69,33 e 28%, respectivamente) ao DNA das *Drosophilas*.

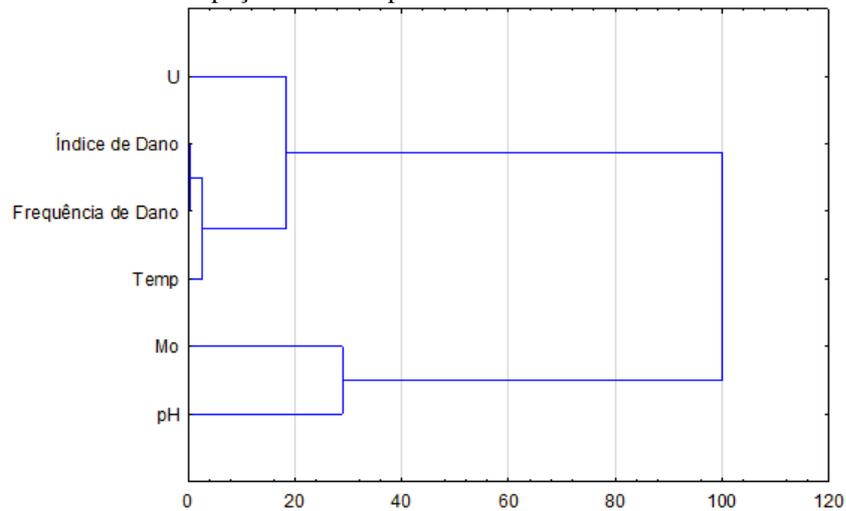
Outro fato que pode ser verificado é o grau de semelhança entre o Molibdênio e o pH no segundo cluster, visto que são variáveis que há aumento quando a outra variável também aumenta, ou seja, quanto maior o pH, maior a disponibilidade deste elemento no solo e, conseqüentemente, na água (MALAVOLTA, 1980).

Vale ressaltar que os demais metais traços e ²²⁶Ra não foram utilizados nesse método, visto que, apresentaram valores abaixo do limite de detecção. No que se refere ao ²²²Rn, cujo parâmetro não foi utilizado, é justificado pela perda do mesmo no instante da utilização dos bioensaios.

4.6.2 Agrupamento de dados relacionados as amostras do município de Abreu e Lima-PE

A figura 17 evidencia o dendrograma de agrupamento de dados utilizando a técnica de Clustering em exatamente 6 variáveis, contidos em amostras de água de poços no município de Abreu e Lima-PE.

Figura 17 – Dendrograma de agrupamentos de dados a partir da técnica de Clustering em amostras de água de poços no município de Abreu e Lima-PE



Fonte: O Autor (2020).

De acordo com a figura 17, é evidenciado um grau de similaridade entre o índice de dano e a frequência de dano em virtude da baixa distância entre essas variáveis. Logo após, um agrupamento com a variável temperatura é ajuntada as variáveis citadas anteriormente, onde pode-se verificar uma alta semelhança entre elas, no entanto, não há muita relevância pelo fato da temperatura ser a mesma para todas as amostras de água de poço no instante do experimento. Não menos importante, o urânio apresenta menor grau de semelhança em relação as descritas, onde foram encontrados valores de $4,16 \mu\text{g L}^{-1}$ no poço AL_1 e $1,17 \mu\text{g L}^{-1}$ no poço AL_2 , sendo o primeiro poço considerado anômalo, segundo Bonotto (2008). Portanto, os danos genotóxicos apresentados na água do poço AL_1 sugerem a ação do Urânio sobre o DNA das larvas de *Drosophilas* semelhante aos dados encontrados na água dos poços da Paraíba. No segundo cluster há um grau de semelhança entre o molibdênio e o pH, apresentando justificativa similar citado no município de São José do Sabugi, Paraíba no presente trabalho. É preciso uma monitorização detalhada desses poços para a verificação de outros elementos químicos que possam estar causando os efeitos genotóxicos na *D. melanogaster*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) De acordo com os parâmetros radiométricos, as concentrações de ^{222}Rn das águas de poços dos municípios em estudo apresentaram-se superiores ao limite máximo permitido pela USEPA, diferentemente das concentrações de ^{226}Ra que obtiveram valores inferiores ao limite de detecção do equipamento, confirmando a presença deste radionuclídeo baseado em estudos prévios;
- b) Dentre os elementos analisados, apenas o urânio apresentou concentrações elevadas, particularmente em poços localizados na Paraíba, excedendo o limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde;
- c) Conforme os bioensaios, os poços que apresentaram diferenças estatisticamente significativas com relação ao índice e frequência de dano foram SJS₂, SJS₃ e AL₁, indicando riscos genotóxicos associados à contaminação das águas;
- d) O ensaio cometa utilizando *Drosophila melanogaster* demonstrou ser um modelo sensível para detecção dos efeitos biológicos em águas sob influência uranifera;
- e) Foi evidenciado através do agrupamento de dados que os danos genotóxicos detectados em *Drosophila melanogaster* apresentados por meio do índice e frequência de danos do Ensaio Cometa esteja relacionado com a presença do urânio nas amostras de água de poços, como demonstrado no dendrograma.

REFERÊNCIAS

- ADRIANO, D. C. **Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals** Trace elements in terrestrial environments, New York: 2nd ed. n. Springer, 2001.
- AHMAD, F.; ROY, K.; O'CONNOR, B.; SHELTON, J.; DOZIER, G.; DWORKIN, I. Fly wing biometrics using modified local binary pattern, SVMs and random forest. **International Journal of Machine Learning and Computing**, v. 4, p. 279–285, 2014.
- ALI, H.; KHAN, E.; ILAHI, I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. **Journal of Chemistry**, 2019.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, p. 869–881, 2013.
- ALMEIDA, M. G. **Estudo para o aproveitamento do urânio como subproduto da fosforita do Nordeste do Brasil**. São Paulo: Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, 1978.
- AMARAL, D. S. **Radônio-222 e radionuclídeos associados em águas de poços e solos em áreas do fosforito uranífero da Região Metropolitana do Recife**. Recife: Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- AMARAL, I. M. R.; NETO, J. F. M.; PEREIRA, G. B.; FRANCO, M. B.; BELETTI, M. E.; KERR, W. E.; BONETTI, A. M.; UEIRA-VIEIRA, C. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. **Micron**, v. 41, p. 123-129, 2010.
- AMARAL, R. S. **Dose na População da Região Urano-Fosfática Pernambucana, devido à Presença de Urânio e ^{226}Ra nos Cultivares**. São Paulo: Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994, 109 p.
- AMARAL, R. S.; MELO, N.; LIMA, R. A.; VALENTIM, E.; SILVEIRA, S. V.; AMARAL, A. Evaluation of ^{226}Ra , ^{228}Ra Levels from Public Drinking Water Supplies in the Area of Great Recife, Brazil. In: **11th International Congress of the International Radiation Protection Association**, Madrid, 2004.
- ANAGNOSTAKIS, M. J. Environmental radioactivity measurements and applications—Difficulties, current status and future trends. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 116, p. 3-7, 2015.
- ANGELL, W. J.; ZEEB, H.; SHANNON, F. Handbook on Indoor Radon: A Public Health Perspective. 2009.
- AOUN, M.; EL SAMAD, O.; BOU KHOZAM, R. Assessment of committed effective dose due to the ingestion of ^{210}Po and ^{210}Pb in consumed Lebanese fish affected by a phosphate fertilizer plant. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 140, p. 25-29, 2015.

APPLETON, J. D. Radon in air and water. In: **Essentials of medical geology**. Springer, Dordrecht, p. 239-277, 2013.

AQUINO, F. S. **Urânio Natural na Dieta e no Leite do Bovino no Agreste Semiárido do Estado de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006, 66 p.

ARAÚJO, E. E. N. **Análise radioquímica de dentes e ossos alveolares de habitantes de área influenciada por material radioativo de ocorrência natural**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 61-72, 2007.

ARORA, M., KIRAN, B., RANI, S., RANI, A., KAUR, B., MITTAL, N. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. **Food Chemistry**, v. 111, p. 811–815, 2008.

ASHBURNER, M.; GOLIC, K. G.; HAWLEY, R. S. **Drosophila – a laboratory handbook**. Ed. 2. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.

ASIC, A. et al. Chemical toxicity and radioactivity of depleted uranium: the evidence from in vivo and in vitro studies. **Environmental research**, v. 156, p. 665-673, 2017.

ASTM, **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20^a ed. Washington: American Public Health Association, 1998.

ATSDR. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. Services H. DRAFT TOXICOLOGICAL PROFILE FOR URANIUM, May 2011.

ATSDR. **Agency for toxic substances and disease registry**. Toxicological Profile for Uranium Health Service, 2011. <http://www.atsdr.cdc.gov>. Acesso em 19 de novembro de 2019.

ATTIX, F. H. **Introduction to radiological physics and radiation dosimetry**. John Wiley & Sons, 2008.

AUVINEN, A.; KURTTIO, P.; PEKKANEN, J.; PUKKALA, E.; ILUS, T.; SALONEN, L.; Uranium and other natural radionuclides in drinking water and risk of leukemia: a case-cohort study in Finland. **Cancer Causes Control**, v. 13, p.825–829, 2002.

AWODELE, O.; POPOOLA, T.D.; AMADI, K.C.; COKER, H.A.B.; AKINTONWA, A. Traditional medicinal plants in Nigeria – Remedies or risks. **Journal of Ethnopharmacology** v. 150, p. 614– 618, 2013.

AXELSSON, A.; RINGBOM, A. On the calculation of activity concentrations and nuclide ratios from measurements of atmospheric radioactivity. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 92, p. 12-17, 2014.

BARTELT, R. J.; SCHANER, A. M.; JACKSON, L. L. *cis*-Vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 11, p. 1747-1756, 1985.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, p. 167-184, 1998.

BENES, P. Migration of radium in the terrestrial hydrosphere. **IAEA (International Atomic Energy Agency) (ed) The behaviour of radium in waterways and aquifers**. Vienna, p. 118-173, 1984.

BIZZI, L. A. **Geologia, Tectônica e Recursos Minerais do Brasil. Brasília: CPRM – Serviço Geológico do Brasil**, 2003, 623 p.

BOLAN, N. S.; ADRIANO, D.C.; NAIDU, R. Role of phosphorus in (Im)mobilization and bioavailability of heavy metals in the soil-plant system. **Reviews Environmental Contamination Toxicology**, v. 177, p. 1–44, 2003.

BOLAN, N. S.; CHOPPALA, G.; KUNHIKRISHNAN, A.; PARK, J.; NAIDU, R. **Microbial transformation of trace elements in soils in relation to bioavailability and remediation**. In: Whitacre MD (ed) *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer New York, NY, p. 1–56, 2013.

BOLAN, N.; KUNHIKRISHNAN, A.; THANGARAJAN, R.; KUMPIENE, J.; PARK, J.; MAKINO, T.; KIRKHAM, M. B.; SCHECKEL, K. Remediation of heavy metal (loid)s contaminated soils to mobilize or to immobilize? **Journal of Hazardous Materials**, v. 266, p. 141–166, 2014.

BONOTTO, D. M.; BUENO, T. O. The natural radioactivity in Guarani aquifer groundwater, Brazil. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 66, p. 1507– 1522, 2008.

BOWEN, J. M. H. **Environmental Chemistry of the Elements**. London: Academies Press, 1979, 273 p.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 685 p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Portaria de Consolidação nº 5, publicada em 28 de setembro de 2017.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.

BRETSCHER, A. J.; HONTI, V.; BINGGELI, O.; BURRI, O.; POIDEVIN, M.; KURUCZ, E.; LEMAITRE, B. The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in *Drosophila melanogaster*. **Biology open**, v. 4, p. 355-363, 2015.

BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A. R.; SASAKI, Y. F. In vivo comet assay workgroup, part of the fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. **Mutation Research**, v. 627, p. 31–35, 2007.

BURNETT, W. C.; AGGARWAL, P. K.; AURELI, A.; BOKUNIEWICZ, H.; CABLE, J. E.; CHARETTE, M.; KONTAR, E.; KRUPA, S.; KULKARNI, K. M.; MOORE, W. S.; OLIVEIRA, J. Quantifying submarine groundwater discharge in the coastal zone via multiple methods. **Science of the Total Environment**, v. 367, p. 498-543, 2006.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Conceptual basis for the application of biomonitoring on stream water quality programs. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, 2003.

BUTLER, M. Animal cell culture and technology. **Taylor & Francis**, 2004.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, Jr., J. F.; MORENO, P. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. In: **Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais**. Belo Horizonte: UFMG, v. 1, p. 1-12, 2004.

CARDOSO, L. X. **Análise de radionuclídeos naturais e artificiais do solo e de produtos alimentícios no Estado de Sergipe, principalmente na região do Platô de Neópolis (SE)**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Sergipe, 2012, 117 p.

CARIGNAN, V.; VILLARD, M. A. Selecting indicator species to monitor ecological integrity: a review. **Environmental monitoring and assessment**, v. 78, p. 45-61, 2002.

CARMO NETO, E. F. **Efeito Genotóxico da contaminação de fontes hídricas por metais pesados e radônio no semiárido potiguar**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

CARMONA, E. R.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity testing of two lead compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 724, p. 35-40, 2011a.

CARMONA, E. R.; GUECHEVA, T. N.; CREUS, A.; MARCOS, R. Proposal of an in vivo comet assay using haemocytes of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, p. 165–169, 2011b.

CARO, T. **Conservation by proxy: indicator, umbrella, keystone, flagship, and other surrogate species**. Island Press, 2010.

CARVALHO, F.; MADRUGA, M. J.; OLIVEIRA, J. M.; LOPES, L.; SEQUEIRA, M. M.; FERRADOR, G. C. Qualidade radiológica da água para consumo em Portugal: águas de superfície e águas subterrâneas. **11º Encontro Nacional de Saneamento Básico**, Faro, Universidade do Algarve, p. 180-181, 2004.

CDTN. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear. **Meio Ambiente**. Disponível em <<http://www.cdtm.br/labs/meio-ambiente/laboratorio-de-espectrometria-de-cintilacao-em-meio-liquido>>. Acesso em 29 de novembro de 2019.

CEMBER, H.; JOHNSON, T. E. **Introduction to Health Physics**. 4 ed., McGrawHill: 2009. 888 p.

CHAKRABARTI, K; CHAKRABARTI, A.; TRIPATHI, S.; DAS, B. Studies on PhysicoChemical and Microbiological Parameters of Water Samples Before and After Jute Retting. **Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 210-215, 2011.

CHMIELEWSKA, I.; CHALUPNIK, S.; BONCZYK, M. Natural radioactivity in drinking underground waters in Upper Silesia and solid wastes produced during treatment. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 93, p. 96-100, 2014.

COLLINS A. R. The Comet assay for DNA damage and repair. principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249–261, 2004.

COLLINS A. R.; GEDIK, C. M.; OLMEDILLA, B.; SOUTHON, S.; BELLIZI, M. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes; large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. **The FASEB Journal**, v. 12, p. 1397–1400, 1998.

COLLINS, A. R.; DUSINSKA, M.; HORVATHOVA, E.; MUNRO, E.; SAVIO, M.; STETINA, R. Inter-individual differences in DNA base excision repair activity measured in vitro with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 16, p. 297–301, 2001.

COLLINS, A. R.; GAIVÃO, I. DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 307–322, 2007.

COLLINS, A. R.; HORVÁTHOVÁ, E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, p. 337–341, 2001.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNGORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-151, 2008.

COLLINS, S. M.; PEARCE, A. K.; REGAN, P. H.; KEIGHTLEY, J. D. Precise measurements of the absolute γ -ray emission probabilities of ^{223}Ra and decay progeny in equilibrium. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 102, p. 15-28, 2015.

CPRM, Serviço Geológico do Brasil. **Projeto Cadastro de Fontes de Abastecimento por Água Subterrânea, 2005**. Disponível em: <<http://www.cprm.gov.br>> Acesso em 8 de agosto de 2018.

DAMASCENA, K. F. R. **Caracterização radiométrica e mineralógica de áreas com potencial radioativo nos estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nature immunology**, v. 14, p. 986-995, 2013.

DEMIR, E.; TURNA, F.; VALES, G.; KAYA, B.; CREUS, A.; MARCOS, R. In vivo genotoxicity assessment of titanium, zirconium and aluminium nanoparticles, and their microparticulated forms, in *Drosophila*. **Chemosphere**, v. 93, p. 2304-2310, 2013

DESOUKY, O.; DING, N.; ZHOU, G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, p. 247-254, 2015.

DINALI, G. S. **Elementos terras raras em materiais derivados da indústria de fosfato no Brasil**. Dissertação de mestrado, Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2014, 107 p.

DIVAN JUNIOR, A. M.; OLIVEIRA, P. L.; PERRY C. T.; V. L.; AZZARINI-ROSTIROLA, L. N.; RAYA-RODRIGUEZ M. T. Using wild plant species as indicators for the accumulation of emissions from a thermal power plant, Candiota, South Brazil. **Ecological Indicators**, v. 9, p. 1156-1162, 2009.

DOS SANTOS JÚNIOR, J. A.; DOS SANTOS AMARAL, R.; MENEZES, R. S. C.; ÁLVAREZ, J. R. E.; DO NASCIMENTO SANTOS, J. M.; FERNÁNDEZ, Z. H.; NETO, J. D. A. M. Influence of terrestrial radionuclides on environmental gamma exposure in a uranium deposit in Paraíba, Brazil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 141, p. 154-159, 2017.

DUARTE, P. J. Depósitos de fosfatos na formação Maria Farinha. **An. Soe. Biol. Pernambuco**, v. 9, 1949.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v. 31, p. 321-339, 1986.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, p. 191-205, 2008.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. DNA oxidation, antioxidant effects, and DNA repair measured with the comet assay. Oxford: **Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications**, p. 261-282, 2010.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; FRANSON, M. A. H. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 20th ed. Washington: American Public Health Association, 1998.

EISENBUD, M.; GESELL, T. **Environmental Radioactivity: From Natural, Industrial, and Military Sources**. New York: Academic Press, 1997. 656 p.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (Eds). **Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, 3ed, 2012. Disponível em: <www.eurachem.org>. Acesso em 11 de fevereiro de 2020.

- ENCISO, J. M.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; OLSEN, A. K.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; AZQUETA, A. Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. **Mutagenesis**, v. 33, p. 25-30, 2018.
- ERSSON, C.; MØLLER, P.; FORCHHAMMER, L.; LOFT, S.; AZQUETA, A.; GODSCHALK, R. W.; MISTRY, V. An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter-laboratory and intra-laboratory variations of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. **Mutagenesis**, v. 28, p. 279-286, 2013.
- ESCOBAR, V. G.; TOMÉ, F. V.; LOZANO, J. C.; SÁNCHEZ, A. M. Determination of ^{222}Rn and ^{226}Ra in aqueous samples using a low-level liquid scintillation counter. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 47, p. 861-867, 1996.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Uranium in foodstuffs, in particular mineral water. **EFSA Journal**, v. 7, n. 4, p. 1018, 2009.
- EVANS, C. J.; HARTENSTEIN, V.; BANERJEE, U. Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. **Developmental Cell**, v. 5, p. 673-690, 2003.
- FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, p. 37-59, 1995.
- FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; BOEDECKER, R. H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 566, p. 209-229, 2004.
- FEIST, B.; MIKULA, B. Preconcentration of heavy metals on activated carbon and their determination in fruits by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 147, p. 302-306, 2014.
- FERRONSKY, V. I. & POLYAKOV, V. A. Environmental isotopes in the hydrosphere. **John Wiley & Sons**, p. 466, 1982.
- FIANCO, A. C. B. **Concentrações de radônio nas águas subterrâneas, rochas e solos de Porto Alegre, RS**. Rio Grande do Sul: Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011, 99 p.
- FLEISCHER, R. L.; RAABE, O. G. Recoiling alpha-emitting nuclei. Mechanisms for uranium-series disequilibrium. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 42, p. 973-978, 1978.
- FORTE, M.; ABBATE, G.; BADALAMENTI, P.; COSTANTINO, S.; LUNESU, D.; RUSCONI, R. Validation of a method for measuring ^{226}Ra in drinking waters by LSC. **Applied Radiation and Isotopes**. v.103, p. 143-150, 2015.

FORTUNATO, J. M. **Comportamento de íons chumbo, cobre, níquel e zinco em área de manguezal associado a antigo lixão no Município de Santos-SP.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

FREITAS, A. V. L.; LEAL, I. R.; UEHARA-PRADO, M.; IANNUZZI, L. **Insetos como indicadores de conservação da paisagem.** In: ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; VAN SLUYS, M.; ALVES, M. A. S. (Eds.) *Biologia da Conservação*. Rio de Janeiro, Editora da UERJ. p. 201-225, 2006.

GAIVÃO, I.; PIASEK, A.; BREVIK, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter-and intra-individual variation. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 45–52, 2009.

GAIVÃO, I.; SIERRA, M. Drosophila comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 304, 2014.

GINÉ-ROSIAS, M. F. **Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS).** Piracicaba: CPG/CENA, 1999, 15p.

GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Archives of toxicology**, v. 90, p. 2315-2336, 2016.

GOLD, K. S.; BRÜCKNER, K. Drosophila as a model for the two myeloid blood cell systems in vertebrates. **Experimental hematology**. v. 42, p. 717-727, 2014.

GOMPEL, N. **Drosophilidae plates**, 2008. Disponível em <<http://gompel.org/images-2/drosophilidae>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2020.

GONZE, M.; MOURLON, C.; CALMON, P.; MANACH, E.; DEBAYLE, C.; BACCOU, J. Modelling the dynamics of ambient dose rates induced by radiocaesium in the Fukushima terrestrial environment. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 147, p. 1-13, 2015.

GOUGET, B. Uranium: Toxicity to Renal Cells and Osteoblasts. **Encyclopedia of Environmental Health**, 2º Ed., p. 259-265, 2019.

GUANGGANG, X.; DIQIU, L.; JIANZHONG, Y.; JINGMIN, G.; HUIFENG, Z.; MINGAN, S.; LIMING, T. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. **Food and Chemical toxicology**, v. 53, p. 352-358, 2013.

GUILLÉN, M. T.; DELGADO, J.; ALBANESE, S.; NIETO, J. M.; LIMA, A.; DE VIVO, B. Heavy metals fractionation and multivariate statistical techniques to evaluate the environmental risk in soils of Huelva township (SW Iberian Peninsula). *Journal of Geochemical Exploration*, v. 119, p. 32–43, 2012.

GUO, H. M.; ZHANG, B.; WANG, G. C.; SHEN, Z. Geochemical controls on arsenic and rare Earth elements approximately along a groundwater flow path in shallow aquifer of the Hetao Basin. **Inner Mongolia Chemical Geology**, v. 270, p. 117-125, 2010.

HAMMEL, W.; DEBUS, R.; STEUBING, L. Mobility of antimony in soil and its availability to plants. **Chemosphere**, v. 41, p. 1791-1798, 2000.

HANG, X.; WANG, H.; ZHOU, J.; DU, C.; CHEN, X. Characteristics and accumulation of heavy metals in sediments originated from an electroplating plant, *Journal of Hazardous*, 163,922-930, 2008.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45–51, 2003.

HAZENFRATZ, R.; MUNITA, C. J. A. S.; GLASCOCK, M. D.; NEVES, E. G. Study of exchange networks between two Amazon archaeological sites by INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 309, 2016, p. 195-205, 2016.

HAZIN, C. A. **Release of Radon from Showers and its Influence on the Balance of Radon Indoors**. Ph. D. Thesis, Atlanta: Georgia Institute of Technology, 1990.

HEILBRON, P. F. L. F.; XAVIER, A. M.; PONTEDEIRO, E. M.; FERREIRA, S. R. **Segurança Nuclear e Proteção do Meio Ambiente**. Rio de Janeiro, E-papers Serviços Editoriais, 2004, 316 p.

HOFFMANN, H.; HÖGEL, J.; SPEIT, G. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. **Mutagenesis**, v. 20, p. 455–466, 2005.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1056 p.

HOLZ, A.; BOSSINGER, B.; STRASSER, T.; JANNING, W.; KLAPPER, R. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. **Development**, v. 130, p. 4955-4962, 2003.

IAEA (1982) International Atomic Energy Agency, **Sediments and pollution in waterways**. IAEA –TECDOC 302, Vienna.

IBGE. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio. 2009. Disponível em: <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?t=acesso-sistema-abastecimento-agua&vcodigo=IU22>. Acesso em 22 de maio de 2019.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons**. Geneva: ISO, N. 13528, p. 66, 2005.

LINTSCHINGER, J.; MICHALKE, B.; Schulte-Hostede, S.; Schramel, P. Studies on speciation of antimony in soil contaminated by industrial activity. **International Journal of Environmental Analytical**, v. 72, p. 11-25, 1998.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, p. 213-236, 2006.

JOHNSON. R. K.; WIEDERHOLM, T.; ROSENBERG, D. M. Freshwater biomonitoring using individual organisms: populations and species assemblages of benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. (Eds.) **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates**, New York: Chapman & Hall, 1993.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**, 4th edn. CRC Press, USA, 2011.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace Elements in Soil and Plants**. Boca Raton, CRC Press Inc., 315 p, 1984.

KASSIE, F.; PARZEFALL, W.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 463, p. 13–31, 2000.

KATSOYIANNIS, A. H. S.; AMMANN, A.; ZIKOUDI, A.; HATZILIONTOS, C. Arsenic speciation and uranium concentrations in drinking water supply wells in Northern Greece: correlations with redox indicative parameters and implications for groundwater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 383, p. 128-140, 2007.

KAWABATA, Y.; YAMAMOTO, M.; APARIN, V. KO. S.; SHIRAISHI, M.; NAGAI, M.; KATAYAMA, Y. Uranium pollution of water in the western part of Uzbekistan. **Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 270, p. 137-141, 2006.

KERSKI, J. "What's Wrong With This Picture? The Declining Water Table." **The Geography Teacher**, v. 11, p. 82-85, 2014.

KIGOSHI, K. Alpha recoil ^{234}Th : Dissolution in water and the $^{234}\text{U}/^{238}\text{U}$ disequilibrium innature. **Science**, v. 173, p. 47–48, 1971.

KRACHLER, M.; VAN WINCKEL, S.; CARDINALE, M.; LYNCH, B.; MURAKAMI, T. Method development for the determination of alkali metals in samples from pyrochemical reprocessing using ICP-OES and comparison with sector field ICP-MS. **Microchemical Journal**. v. 105, p. 9-14, 2012.

KUMAR, M.; SINGH, S.; MAHAJAN, R. K. Trace level determination of U, Zn, Cd, Pb and Cu in drinking water samples. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 112, p. 337-342, 2006.

KURTOVIC, A.; WIDMER, A.; DICKSON, B. J. A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. **Nature**, v. 446, p. 542-546, 2007.

- LAMA, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 182-186, 2003.
- LAMONTAGNE, S.; TAYLOR, A. R.; HERPICH, D.; HANCOCK, G. J. Submarine groundwater discharge from the South Australian Limestone Coast region estimated using radium and salinity. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 140, p. 30-41, 2015.
- LANGMUIR, D. **Aqueous environmental geochemistry**. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1997, 600 p.
- LANDON, J. R. **Booker tropical soil manual**. Longman Scientific and technical, Booker Tate Ltd. United Kingdom, 1996.
- LANGMUIR, D. & HERMAN, J. S. The mobility of thorium in natural waters at low temperatures. *Geochimica et Cosmochimica acta*, n. 44, p. 1753-1766, 1980.
- LANOT, R.; ZACHARY, D.; HOLDER, F.; MEISTER, M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. **Developmental Biology**, v. 230, p. 243-257, 2001.
- LEBRETON, S.; BECHER, P. G.; HANSSON, B. S.; WITZGALL, P. Attraction of *Drosophila melanogaster* males to food-related and fly odours. **Journal Insect Physiology**, v. 58, p. 125-129, 2012.
- LEBRETON, S.; TRONA, F.; ECHEVERRY, F. B.; BILZ, F.; GRABE, V.; BECHER, P. G.; CARLSSON, M. A.; NÄSSEL, D. R.; HANSSON, B. S.;
- LEITAO, A. B.; SUCENA, E. *Drosophila* sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. **eLife**, v. 4, p. e06166, 2015.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 697-743, 2007.
- LEMES, M. J. L.; FIGUEIREDO, F. P. M.; PIRES, M. A. F. **Química Nova**, v. 26, p. 356, 2003.
- LENZ, S.; KARSTEN, P.; SCHULZ, J. B.; VOIGT, A. *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, p. 453-460, 2013.
- LIESCH, T.; HINRICHSSEN, S.; GOLDSCHIEDER, Nico. Uranium in groundwater—fertilizers versus geogenic sources. **Science of the Total Environment**, v. 536, p. 981-995, 2015.
- LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 57, p. 195-211, 1993.
- LOPES, B. G. C. **Levantamento da entomofauna bioindicadora da qualidade ambiental em diferentes áreas do alto Jequitinhonha - Minas Gerais**. (Monografia de Graduação) – Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes, Inconfidentes, 2008.

LOURENÇO, J.; CASTRO, B. B.; MACHADO, R.; NUNES, B.; MENDO, S.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Genetic, biochemical, and individual responses of the teleost fish *Carassius auratus* to uranium. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, p. 1023-1031, 2010.

LUCAS, E. R.; AUGUSTYNIAK, M.; KEDZIORSKI, A.; KELLER, L. Lifespan differences between queens and workers are not explained by rates of molecular damage. **Experimental gerontology**, v. 92, p. 1-6, 2017.

PASHA, M.; SANJEEV, G.; SHIVANANNDAPPA, T.; RAMESH, S. R. Radioprotective potential of *Decalepis hamiltonii*: A study on gamma radiation-induced oxidative stress and toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Radiation Protection and Environment**, v. 39, p. 183, 2016.

MACHADO, Ê. L.; SALES DAMBROS, V.; KIST, L. T.; ALCAYAGA LOBO, E. A.; TEDESCO, S. B.; MORO, C. C. Use of Ozonization for the Treatment of Dye Wastewaters Containing Rhodamine B in the Agate Industry. **Water Air Soil Pollution**, 2011.

MAHIMAIRAJA, S.; BOLAN, N. S.; ADRIANO, D. C.; ROBINSON, B. Arsenic contamination and its risk management in complex environmental settings. **Advances in Agronomy**, v. 86, p. 1-82, 2005.

MAKHIJANI, K.; ALEXANDER, B.; TANAKA, T.; RULIFSON, E.; BRÜCKNER, K. The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. **Development**, v. 138, p. 5379-5391, 2011.

MAKHIJANI, K.; BRÜCKNER, K. Of blood cells and the nervous system: Hematopoiesis in the *Drosophila* larva. **Fly**, v. 6, p. 254-260, 2012.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MARCOVECCHIO, J. E.; BOTTE, S. E.; FREIJE, R. H. **Heavy metals, major metals, trace elements**. Handbook of water analysis. CRC Press, London, 2007.

MARGERIT, A.; LECOMTE-PRADINES, C.; SVENDSEN, C.; FRELON, S.; GOMEZ, E.; GILBIN, R. Nested interactions in the combined toxicity of uranium and cadmium to the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 118, p. 139-148, 2015.

MÁRKUS, R.; LAURINYECZ, B.; KURUCZ, É.; HONTI, V.; BAJUSZ, I.; SIPOS, B.; ANDÓ, I. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 4805-4809, 2009.

MAXWELL, O.; WAGIRAN, H.; LEE, S. K.; EMBONG, Z.; UGWUOKE, P. E., Radioactivity level and toxic elemental concentration in groundwater at Dei-Dei and Kubwa areas of Abuja, north-central Nigeria. **Radiation Physics and Chemistry**, v.107, p. 23-30, 2015.

- MAZZILLI, B. P.; MÁDUAR, M. F.; DE CAMPOS, M. P. Radioatividade no meio ambiente e avaliação de impacto radiológico ambiental. **IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares)**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. 92 p.
- MCCOMISH, M. F.; ONG, J. H. Trace metals. In: Environmental inorganic chemistry: **Properties, processes, and estimation methods**. New York: Pergamon Press, p. 1-12, 1988.
- MEDLEY, P.; MARTIN, P.; BOLLHOFER, A.; PARRY, D. ^{228}Ra and ^{226}Ra measurement on a BaSO_4 co-precipitation source. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 96, p. 200-207, 2015.
- MICHEL, J. Relationship of radium and radon with geological formations. **Radon, radium and uranium in drinking water**, v. 7, p. 83-95, 1990.
- MILVY, P.; COTHERN, C. R. Naturally occurring radionuclides in drinking water: an exercise in risk benefit analysis. **Environmental geochemistry and health**, v. 11, p. 63-72, 1989.
- MØLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 98, p. 336-345, 2006.
- MOLDAN, B.; CERNY, J. **Biogeochemistry of small catchments: a tool for environmental research**. John Wiley & Sons, 1994.
- MØLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, p. 1-7, 2018.
- MØLLER, P.; KNUDSEN, L. E.; LOFT, S.; WALLIN, H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 1005–1015, 2000.
- MOMODU, M. A.; ANYAKORA, C. A. Heavy metal contamination of ground water: the Surulere case study. **Research Journal of Environmental and Earth Sciences**, v. 2, p. 39–43, 2010.
- MOORE, W. S.; SHAW, T. J. Chemical signals from submarine fluid advection onto the continental shelf. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 103, p. 21543-21552, 1998.
- MORAIS, V. H. T. **Uso de *Biomphalaria glabrata* na avaliação embriotóxica, citotóxica e genotóxica em águas de poços artesianos com influência de materiais radioativos de ocorrência natural (NORM)**. Dissertação de mestrado: Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Pernambuco, 2020.
- MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D. K.; BAJIPAYEE, M.; DHAWAN, A. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 19, n. 2, p. 85-90, 2004.
- NASCIMENTO, R. P.; MORINI, M. S. C.; BRANDÃO, C. R. F. Mirmecofauna do Parque natural municipal da Serra do Itapety. In: **ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), p. 339-341, 2001.

- NAZAROFF, W. W.; DOYLE, S. M.; NERO, A. V.; SEXTRO, R. G. Potable water as a source of airborne ^{222}Rn in U. S. dwellings: A review and assessment. **Health Physics**, v. 52, p. 281-295, 1987.
- NEWMAN, M. C.; UNGER, M. A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2 ed. Boca Raton, USA: Lewis Publishers, 2003.
- NICHOLS, E.; LARSEN, T.; SPECTOR, S.; DAVIS, A. L.; ESCOBAR, F.; FAVILA, M.; VULINEC, K. Global dung beetle response to tropical forest modification and fragmentation: A quantitative literature review and meta-analysis. **Biological Conservation**, v. 137, p. 1-19, 2007.
- NRIAGU, J.; NAM, D. H.; AYANWOLA, T. A.; DINH, H.; ERDENECHIMEG, E.; OCHIR, C.; BOLORMAA, T. A. High levels of uranium in groundwater of Ulaanbaatar, Mongolia. **Science of the Total Environment**, v. 414, p. 722-726, 2012.
- NUNES, J. A. **Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino**. Dissertação de mestrado, Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, São Paulo, 2009. 77 p.
- OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, v. 27, p. 185-200, 2013.
- OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. **Física das Radiações**. São Paulo: Oficina de Textos, 2010
- OLIVEIRA, T. C. **Estabelecimento de metodologia para determinação de ^{93}Zr em rejeitos radioativos por Espectrometria de Cintilação Líquida (LSC) e Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)**. Tese de Doutorado. Belo Horizonte, UFMG, 2014, 113p.
- OLIVEIRA, R. M. P. **Efeito genotóxico das águas superficiais do baixo curso da bacia hidrográfica do Rio Capibaribe, Pernambuco-Brasil**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, 2019.
- OSTLING, 650; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.
- PANDEY, A. K.; NAGPURE, N. S.; TRIVEDI, S. P.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B. Profenofos induced DNA damage in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, p. 209-214, 2011.
- PASTURA, V. F. D. S.; CAMPOS, T. F. D. C.; PETTA, R. A. **Determinação das Doses Equivalentes Devido a Ingestão de Radionuclídeos das Séries do Urânio e Tório Presentes em Águas de Consumo do Município de Santa Luzia, Estado da Paraíba**, 2011.
- PAYNE, M.; TURNER, J.; SHELTON, J.; ADAMS, J.; CARTER, J.; WILLIAMS, H.; HANSEN, C.; DWORKIN, I.; DOZIER, G. Fly wing biometrics. **IEEE Symposium on**

Computational Intelligence in Biometrics and Identity Management (CIBIM). p. 42–46, 2013.

PEARCE, J. L. & VENIER, L. A. The use of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) and spiders (Araneae) as bioindicators of sustainable forest management: a review. **Ecological Indicators**, v. 6, p. 780-793, 2006.

PEARSON, A. J.; GAW, S.; HERMANSPAHN, N.; GLOVER, C. N. Natural and anthropogenic radionuclide activity concentrations in the New Zealand diet. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 145, p. 1-8, 2015.

PERKINELMER. **Tópicos avançados em ICP-MS**. Orientacao sobre validacao de metodos analiticos, no DOQ-CGCRE-008. São Paulo, 2009. INMETRO, 2011.

PIERCE; BENJAMIN A. **Genetics, a conceptual approach**. 6° ed. New York: W.H. Freeman, 2012, 573 – 607 p.

PLUM, H.; DIETZE, G.; ARMBRUSTER, V.; WIRSING, G. **Natürliche Geogene Grundwasserbeschaffenheit in den hydrogeochemischen Einheiten von Baden-Württemberg** Freiburg i. Br. (Ed.), Regierungspräsidium Freiburg LfG, Rohstoffe und Bergbau, 2009. 277 p.

POLETO, C.; MARTINEZ, L. L. G. Sedimentos urbanos: água e ambiente. **Hollos Environment**, v. 11, p. 1, 2011.

POLKOWSKA-MOTREKON, H.; FUKS, L.; KALBARCZYK, P.; DUDEK, J.; KULISA, K.; OSZCZAK, A.; ZUBA, M. Preparation of water samples for proficiency testing on radionuclides. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 103, p. 61-64, 2015.

PONTEDEIRO, E. M. B. D. **Avaliação de Modelos de Impactos Ambientais para Deposição de Resíduos Sólidos com Radionuclídeos Naturais em Instalações Minerárias Industriais**. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

PORCELLI, D. Investigating groundwater processes using U-and Th-series nuclides. **Radioactivity in the Environment**, v. 13, p. 105-153, 2008.

PRADO, G. R. **Estudo de contaminação ambiental por urânio no município de Caetité-BA, utilizando dentes humanos como bioindicadores**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, 2007.

PRAT, O.; VERCOUTER, T.; ANSOBORLO, E.; FICHET, P.; PERRET, P.; KURTTIO, P.; SALONEN, L. Uranium speciation in drinking water from drilled wells in Southern Finland and its potential links to health effects. **Environmental Science Technology**, v. 43, p. 3941–3946, 2009.

PRICHARD, H. W.; GESELL, T. F. Rapid measurements of ^{222}Rn concentrations in water with a commercial liquid scintillation counter. **Health Physics**, v. 33, p. 577-581, 1977.

KUBITZA, F. **Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões**. F. Kubitza, 2003.

QUEVAUVILLER, P.; THOMPSON, K. C., **Analytical Methods for Drinking Water**. 1 ed. Wiley, p. 200, 2005.

RAMOLA, R. C.; SINGH, S.; VIRK, H. S. **Radiation Measurements**, v. 15, p. 791–793, 1988.

RANI, A.; MITTAL, S.; MEHRA, R.; RAMOLA, R. C. Assessment of natural radionuclides in the soil samples from Marwar region of Rajasthan, India. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 101, p. 122-126, 2015.

RAVICHANDRAN, K.; JAYPRAKASH, M. Seasonal variation on physico-chemical parameters and trace metals in groundwater of an industrial area of north Chennai, India. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, p. 646 - 649, 2011.

REINERS, W. A.; MARKS, R. H.; VITOUSEK, P. M. Heavy metals in subalpine soils of New Hampshire. **Oikos**, v. 26, p. 264, 1975.

ROBERTS, D. B. **Drosophila, A Practical Approach**. Ed. 2. New York, NY: Oxford University Press, 1998.

ROESER, P. A.; FRANZ, S. O.; LITT, T.; ÜLGEN, U. B.; HILGERS, A.; WULF, S.; WENNRICH, V.; ÖN, S. A.; VIEHBERG, F. A.; ÇAGATAY, M. N.; MELLES, M. Lithostratigraphic and geochronological framework for the paleoenvironmental reconstruction of the last ~36 ka cal BP from a sediment record from Lake Iznik (NW Turkey). **Quaternary International**, v. 274, p. 73-87, 2012.

ROJAS, E.; LORENZO, Y.; HAUG, K.; NICOLAISSEN, B.; VALVERDE, M. Epithelial cells as alternative human biomatrices for comet assay. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 386, 2014.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 167-172, 2001.

SAAD, S. **Aspectos econômicos do aproveitamento do urânio associado aos fosfatos do Nordeste**. Ministério das Minas e Energia, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Diretoria Executiva da Área Mineral, 1974.

SACHSE, S.; WITZGALL, P. Feeding regulates sex pheromone attraction and courtship in *Drosophila* females. **Scientific Reports**, v. 5, p. 131-132, 2015.

SALBU, B. Challenges in radioecology. **Journal of environmental radioactivity**, v. 100, p. 1086-1091, 2009.

SANTANA, S. L. **Aplicação do organismo modelo *Drosophila melanogaster* para detecção da genotoxicidade associada à poluição atmosférica**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

- SANTOS JÚNIOR, J. A.; AMARAL, R. S.; MENEZES, R. S. C.; ÁLVAREZ, J. R. E.; SANTOS, J. M. N.; FERNÁNDEZ, Z. H.; BEZERRA, J. D.; SILVA, A. A.; DAMASCENA, K. F. R.; NETO, J. A. M. Influence of terrestrial radionuclides on environmental gamma exposure in a uranium deposit in Paraíba, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 154-159, 2017.
- SANTOS JÚNIOR, J. A.; AMARAL, R. S.; SILVA, C. M.; MENEZES, R. S. C.; BEZERRA, J. D. Radium-228 as an indicator of Thorium-232 presence in a soil in Pernambuco, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, p. 650-652, 2009.
- SANTOS, F. P. C. **Radionuclídeos naturais em águas minerais comercializadas na cidade de Recife – PE**. Recife: PROTEN/UFPE, 2010, 61 p.
- SANTOS, M. L. O.; FARIAS, E. E. G.; AMARAL, D. S.; HAZIN, C. A.; FRANÇA, E. J.; SOUZA, N. Construction of growth curve of Rn-222 activity for use as a calibration factor for determination of Rn-222 in water by LSC.
- SARIN, M.M.; KRISHNA SWAMI, S.; SHARMA, K. K.; TRIVEDI, J. R. Uranium isotopes and radium in the Bhagirathi-Alaknanda river system: Evidence for high uranium mobilization in the Himalaya. **Current Science** 62(12):801–805, 1992.
- SCHLIEF, M. L.; WILSON, R. I. Olfactory processing and behavior downstream from highly selective receptor neurons. **Nature Neuroscience**, v. 10, p. 623-630, 2007.
- SEMMELHACK, J. L.; WANG, J. W. Select *Drosophila glomeruli* mediate innate olfactory attraction and aversion. **Nature**, v. 459, p. 218-223, 2009.
- SHAH, M. H.; IQBAL, J.; SHAHEEN, N.; KHAN, N.; CHOUDHARRY, M. A.; AKHTER, G. Assessment of background levels of trace metals in water and soil from a remote region of Himalaya. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 184, p. 1243-1252, 2012.
- SHARMA, A.; SHUKLA, A. K.; MISHRA, M.; CHOWDHURI, D. K. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research**, v. 721, p. 142-146, 2011.
- SHUKLA, A. K.; PRAGYA, P.; CHOWDHURI, D. K. A modified alkaline Comet assay for in vivo detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 726, p. 222-226, 2011.
- SIDDIQUE, H. R.; GUPTA, S. C.; DHAWAN, A.; MURTHY, R. C.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 46, p. 189-197, 2005.
- SIEGEL, F.R. Review of research on modern problems in geochemistry. **Earth Sciences, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization**, N.Y., v. 16, 1979.
- SILVA, A. A. **Avaliação radiométrica em água subterrânea consumida pela população em municípios das mesorregiões da Borborema, Central Potiguar e Sertão Paraibano**. Tese

(Doutorado em Tecnologias Energéticas Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, 2018.

SILVA, A. A. **Dosimetria Radioecológica na Ocorrência Uranífera de São José de Espinharas – PB**. Recife: Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares), Departamento de Energia Nuclear (DEN) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014, 59 p.

SILVA, C.; GARY, B. D.; RAU, M. E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, p. 367-379, 2000.

SINGH, J.; SINGH, L.; SINGH, S. High U-contents observed in some drinking waters of Punjab, India. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 26, p. 217-222, 1995.

SINGH, N. P.; SINGH, M.; SINGH, S.; VIRK, H. S. Uranium and radon estimation in water and plants using SSNTD. **Nuclear Tracks Radiation Measurements**, v. 8, p. 483-486, 1984.

SINGH, J.; SINGH, H.; SINGH, S.; BAJWA, B. S. Estimation of uranium and radon concentration in some drinking water samples. **Radiation Measurements**, v. 43 (supplement 1), p. 523-526, 2008.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SMITH, L. A.; MEANS, J. L.; CHEN, A.; ALLEMAN, B.; CHAPMAN, C. C.; TIXIER, J. S.; BRAUNING, S. E.; GAVASKAR, A. R.; ROYER, M. D. **Remedial options for metals-contaminated sites**. Boca Raton: CRC Press, 1995.

SOMOROVSKÁ, M.; SZABOVÁ, E.; VODICKA, P.; TULINSKÁ, J.; BARANCOKOVÁ, M.; FÁBRY, R.; RAUSOVA, K. Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the comet assay with cytogenetic methods and immunology. **Mutation Research**, v. 445, p. 181-192, 1999.

SONG, G.; WANG, X.; CHEN, D.; CHEN, Y. Contribution of ²²²Rn-bearing water to indoor radon and indoor air quality assessment in hot spring hotels of Guangdong, China. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 102, p. 400-406, 2011.

SOUZA, E. M. **Estratigrafia da sequência clástica inferior (andares coniaciano-maastrichtiano inferior) da Bacia da Paraíba e suas implicações paleogeográficas**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG, Recife, 2006. 375 p.

SOWMITHRA, K.; SHETTY, N. J.; HARINI, B. P.; JHA, S. K.; CHAUBEY, R. C. Effects of acute gamma radiation on the reproductive ability of the earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 140, p. 11-15, 2015.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). In: DNA repair protocols. **Humana Press**, p. 203-212, 1999.

SPEIT, G.; TRENZ, K.; SCHÜTZ, P.; ROTHFUß, A.; MERK, O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. **Toxicology letters**, v. 110, p. 73-78, 1999.

STREFFER, C. The ICRP 2007 recommendations. **Radiation protection dosimetry**, v. 127, p. 2-7, 2007.

SZETO, Y. T.; BENZIE, I. F. F.; COLLINS, A. R.; CHOI, S. W.; CHENG, C. Y.; YOW, C. M. N.; TSE, M. M. Y. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 578, p. 371-381, 2005.

TAUHATA, L.; SALATI I. P. A.; DI PRINZIO, R.; DI PRINZIO, A. R. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. Rio de Janeiro – IRD/CNEN, 2003.

TICE R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; SASAKI, Y. F. The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206–221, 2000.

TRINDADE, I. R.; SÁ, J. M.; MACEDO, M. H. F. Comportamento de elementos químicos em rochas mineralizadas em ouro na Faixa Seridó, Província Borborema. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 38, p. 303-318, 2008.

TURNER, J. E. *Atoms, Radiation, and Radiation Protection*. Third, Completely Revised and Enlarged Edition, 2007.

UNSCEAR - United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. **Sources and Effects of Ionizing Radiation**, anexo I. UNSCEAR Report to the United Nations General Assembly, 2000.

UNSCEAR – United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. **Sources and effects of ionizing radiation**, UNSCEAR report 2008, v.1, annex B, United Nations Publications, New York: 2008.

URBAN, N. A.; SWIHART, R. K.; MALLOY, M. C.; DUNNING JR, J. B. Improving selection of indicator species when detection is imperfect. **Ecological Indicators**, v. 15, p. 188-197, 2012.

URIOL, E.; SIERRA, M.; COMENDADOR, M. A.; FRA, J.; MARTÍNEZ-CAMBLOR, P.; LACAVE, A. J.; SIERRA, L. M. Long-term biomonitoring of breast cancer patients under adjuvant chemotherapy: the comet assay as a possible predictive factor. **Mutagenesis**, v. 28, p. 39–48, 2012.

USGS. History of the National Uranium Resource Evaluation Hydrogeochemical and Stream Sediment Reconnaissance Program. U.S. Geological Survey. <http://pubs.usgs.gov>. Acesso em: 19/11/2019.

VANDECASTEELE, C.; BLOCK, C. **Modern methods for trace element determination**. 1st ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 1997, 330 p.

VARLEY, A.; TYLER, A.; SMITH, L.; DALE, P. Development of a neural network approach to characterize ²²⁶Ra contamination at legacy sites using gamma-ray spectra taken from boreholes. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 140, p. 130-140, 2015.

VASILE, M.; BENEDIK, L.; ALTZITZOGLOU, T.; SPASOVA, Y.; ATJEN, U. W.; GONZALEZ DE ORDUNA, R.; HULT, M.; BEYERMANN, M.; MIHALCEA, I. ²²⁶Ra and ²²⁸Ra determination in mineral waters-Comparison of methods. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 68, p. 1236-1239, 2010.

VERÇOSA, C. J. **Aplicação do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação da genotoxicidade ambiental**. Recife: Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada) - Universidade de Pernambuco, 2015a.

VERÇOSA, C. J.; CASTRO, I. F. A.; GARCIA, A. C. L. ROHDE, C. An efficient rearing population cage to expose drosophilids to various environmental agents. **Drosophila Information Service**, v. 98, p. 144-145, 2015b.

VERÇOSA, C. J.; MORAES FILHO, A. V.; CASTRO, I. F. A.; SANTOS, R. G.; CUNHA, K. S.; MELO E SILVA, D.; GARCIA, A. C. L.; NAVONI, J. A.; AMARAL, V. S.; ROHDE, C. Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 148-153, 2017.

VERSCHAEVE, L. Genotoxicity studies in groundwater, surface waters, and contaminated soil. **The Scientific World Journal**, v. 2, p. 1247-1253, 2002.

VIEHBERG, F. A.; ÜLGEN, U. B.; DAMCI, E.; FRANZ, S. O.; ÖN, S. A.; ROESER, P. A.; ÇAGATAY, M. N.; LITT, T.; MELLES, M. Seasonal hydrochemical changes and spatial sedimentological variations in Lake Iznik (NW Turkey). **Quaternary International**, v. 274, p. 102-111, 2012.

WANG, L.; ANDERSON, D. J. Identification of an aggression-promoting pheromone and its receptor neurons in *Drosophila*. **Nature**, v. 463, p. 227-231, 2010.

WERTHEIM, B.; VET, L. E. M.; DICKE, M. Increased risk of parasitism as ecological costs of using aggregation pheromones: Laboratory and field study of *Drosophila*-*Leptopilina* interaction. **Oikos**, v. 100, p. 269-282, 2003.

WHEELER, M. R. Additions to the catalog of the world's *Drosophilidae*. **The genetics and biology of *Drosophila***, v. 3, p. 395-409, 1986.

WHO (World Health Organization), 2004. **Guidelines for drinking water quality: radiological aspects**. Disponível em:

<http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf>. Acesso em 8 de fevereiro de 2020.

WINK, C., GUEDES, J. V. C. FAGUNDES, C. K.; ROVEDDER, A. P. Insetos edáficos como indicadores da qualidade ambiental. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 4, p. 60-71, 2005.

WOOD, W.; JACINTO, A. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 8, p. 542-551, 2007.

WU, Y.; WANG, Y.; XIE, X. Occurrence, behavior and distribution of high levels of uranium in shallow groundwater at Datong basin, northern China. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 809-817, 2014.

YOUNG, S. D. **Chemistry of heavy metals and metalloids in soils. In: Alloway JB (ed) Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability.** Springer Netherlands, Dordrecht, p. 51–95, 2013.

YOUSEF, H. A.; AFIFY, A.; HASAN, H. M.; MEGUID, A. A. DNA damage in hemocytes of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) exposed to contaminated food with cadmium and lead. **Natural. Science**, v. 2, p. 292-297, 2010.

ZHANG, C.; LI, Q.; ZHANG, M.; ZHANG, N.; LI, M. Effects of rare elements on growth and metabolism of medicinal plants. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, p. 2-24, 2013.