



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

DANUSA MOURA VIEIRA

USO DA *TRADESCANTIA PALLIDA* PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITO GENOTÓXICO
DA EXPOSIÇÃO AO RADÔNIO E *SEUS DESCENDENTES*

Recife

2022

DANUSA MOURA VIEIRA

**USO DA *TRADESCANTIA PALLIDA* PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITO
GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO AO RADÔNIO E *SEUS DESCENDENTES***

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

Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. José Araújo dos Santos Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes

Recife

2022

Catálogo na fonte

Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

V658u

Vieira, Danusa Moura.

Uso da *Tradescantia Pallida* para avaliação dos efeitos genotóxicos da exposição ao Radônio e seus descendentes / Danusa Moura Vieira. - 2022.

76 folhas, il.; tab.

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

Coorientador: Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2022.

Inclui Referências.

1. Energia Nuclear. 2. NORM. 3. 222Rn. 4. *Tradescantia Pallida*.
5. Biomonitoramento. I. Santos Júnior, José Araújo dos (Orientador). II. Fernandes, Thiago de Salazar e (Coorientador). III. Título.

DANUSA MOURA VIEIRA

**USO DA *TRADESCANTIA PALLIDA* PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITO
GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO AO RADÔNIO E SEUS DESCENDENTES**

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

Aprovado em: 04/03/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Romilton dos Santos Amaral (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eduardo Eudes Nobrega de Araújo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

A minha mãe, irmão e aos amigos do Grupo de Radioecologia (RAE). Dedicó.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a muitos que de forma, direta ou indiretamente, participaram do processo que culminou com a elaboração desta Dissertação, que exigiu muito empenho e força de vontade, portanto minha gratidão será eterna a todos que contribuíram nesta jornada.

Agradeço a Deus por tudo, pela minha vida e fé no momento de encarar os obstáculos, pela oportunidade maravilhosa que me proporcionou de realizar este trabalho e principalmente pela sua primordial companhia em todos os momentos dessa “Importante Caminhada”.

Agradeço a minha família pelo carinho, colaboração incondicional e compreensão. Sempre me guiando pela estrada da vida, porém respeitando minhas escolhas. Nossa união é a grande força que temos. Especialmente a minha mãe Célia Moura pela minha educação e apoio constante, em todos os momentos da minha vida. Meu irmão Diego Moura pelo o apoio em todos os momentos.

Ao Profº Dr. José Araújo dos Santos Júnior, meu orientador, Vice-Diretor do Centro de Tecnologia e Geociências - Escola de Engenharia de Pernambuco (CTG-EEP), pela acolhida quando cheguei ao PROTEN- DEN - UFPE, em um momento tão delicado de pandemia, pela confiança depositada, pelos valiosos ensinamentos científicos e pessoais, pelo apoio e grande ajuda nos momentos de dúvidas e dificuldades, liberdade e, especialmente, por sua amizade. Sinto-me privilegiado por ter tido a oportunidade de conhecer e trabalhar com uma pessoa íntegra, de competência e profissionalismo incontestável. Somos muito gratos por se preocupar com o bem estar do grupo e procurar sempre a melhor forma de nos ajudar.

Ao Profº Dr. Thiago de Salazar e Fernandes, do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da universidade federal de Pernambuco, por ter-me oferecido a oportunidade de ingressar no Grupo de Radioecologia da Universidade Federal de Pernambuco, pela confiança e credibilidade, pela disponibilidade e atenção com que sempre me recebeu, para esclarecer minhas dúvidas, sobretudo, na área citogenética vegetal.

Ao Dr. Elvis Joacir de França, Vice - Coordenador do Programa de Tecnologias Energéticas e Nucleares, Coordenador da Seção de Análises Radiométricas (SECARA) do Serviço de Monitoração Ambiental (SEAMB), do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE) pela acolhida e utilização dos laboratórios e equipamentos.

A todos os servidores do DEN-UFPE pela excelente condição oferecida na realização deste projeto, em particular, à secretaria do PROTEN e a Srª Maria Araújo (LIA).

Ao Programa de Tecnologias Energéticas e Nucleares (PROTEN), pela minha formação, por me apresentarem a pesquisa, pelos ensinamentos valiosos, incentivo e apoio.

Aos Laboratórios do DEN-UFPE pela infraestrutura disponibilizada.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa, pela amizade e companheirismo na busca de um mesmo ideal. Conseguimos constituir uma verdadeira família durante todos esses anos de convivência.

A todos os amigos que estiveram presentes em minha vida e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial Marcela Ferreira Marques e Maria Rita Araújo.

A todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para o sucesso deste trabalho.

RESUMO

A Radioatividade está presente no planeta desde a sua formação, principalmente pelos radioisótopos que constituem a crosta terrestre, os chamados *Naturally Occurring Radioactive Material* (NORM), cujo radionuclídeo de maior relevância é o Rn222 seguido de seus progênie. Este trabalho avaliou o uso de um vegetal, a *Tradescantia Pallida*, como um indicador biológico para a presença de Rn222 através da frequência de micronúcleo por tétrade na espécie (TRAD-MNC). O bioensaio foi validado a partir da exposição da planta a fonte de Co60 a doses de 5Gy e 10Gy. A exposição controlada foi realizada em uma câmara de Rn222 por 2, 4 e 6 dias com uma concentração média de 1790 ± 219 Bq.m⁻³, 2000 ± 221 Bq.m⁻³ e 2100 ± 241 Bq.m⁻³, respectivamente. A relação de expressão de micronúcleo por tétrade, expressa quando ocorre lesão a nível de DNA, em cada análise foi: $0,02 \pm 0,01$; $0,09 \pm 0,01$ e $0,12 \pm 0,05$, nesta ordem, indicando assim sensibilidade mínima à exposição do Rn222 pelo biondicador vegetal. No simulador de ambiente natural a *Tradescantia* foi exposta de forma continua a níveis de concentrações de radiação natural por 30, 60 e 90 dias a uma dose média em torno de $24,48 \pm 2,85$ Bq.m⁻³, sendo comprovada a sensibilidade da planta após o período de 90 dias com uma relação de $0,097 \pm 0,025$ micronúcleos por tétrade. O bioensaio demonstrou a sensibilidade mínima da espécie ao ²²²Rn tanto em condições controladas quanto à radiação ambiental de NORM.

Palavras-chave: NORM; Rn222; *Tradescantia Pallida*; biomonitoramento; TRAD-MNC.

ABSTRACT

Radioactivity has been present on Earth since its formation, mainly through radioisotopes that constitute the Earth's crust, the so-called Naturally Occurring Radioactive Material (NORM), whose most relevant radionuclide is Rn222 followed by its progeny. In this work, the use of a plant, *Tradescantia Pallida*, was evaluated as a qualitative biological indicator of the presence of Rn222 through the micronucleus frequency per tetrad in the species (TRAD-MNC). The bioassay was validated by exposing the plant to the source of Co60 at doses of 5Gy and 10Gy. Controlled exposure was performed in a Rn222 chamber for 2, 4 and 6 days with a mean concentration of 1790 ± 219 Bq.m⁻³, 2000 ± 221 Bq.m⁻³ and 2100 ± 241 Bq.m⁻³, respectively. The ratio of micronucleus expression per tetrad, expressed when DNA damage occurs, in each analysis was: 0.02 ± 0.01 ; 0.09 ± 0.01 and 0.12 ± 0.05 , in that order, thus indicating minimal sensitivity to Rn222 exposure by the plant bioindicator. In the natural environment simulator, *Tradescantia* was continuously exposed to levels of natural radiation concentrations for 30, 60 and 90 days at an average dose of 24.48 ± 2.85 Bq.m⁻³, proving the sensitivity of the plant after the 90 days period with a ratio of 0.097 ± 0.025 micronuclei per tetrad. The bioassay demonstrated the minimum sensitivity of the species to Rn222, both under controlled conditions and to environmental NORM radiation.

Keywords: NORM; Rn; *Tradescantia Pallida*; biomonitoring; TRAD- MNC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exposição do homem à radiação ionizante	18
Figura 2 -	Contribuição da dose efetiva derivada das fontes de radioatividade natural	19
Figura 3 -	Sequência de efeitos que podem ser causados pelas radiações ionizantes	20
Figura 4 -	Esquema de biomonitoramento de plantas bioindicadores	26
Figura 5 -	Morfologia vegetal da <i>Tradescantia pallida</i>	28
Figura 6 -	Inflorescência da <i>Tradescantia</i> clone #4430	28
Figura 7 -	Pêlo do estame da <i>Tradescantia</i>	31
Figura 8 -	Inflorescência jovem	34
Figura 9 -	Divisão celular	35
Figura 10 -	Diagrama de formação de micronúcleos em tétrades de <i>Tradescantia</i> (A) e microscopia óptica com visualização de micronúcleo (seta) em (B)	36
Figura 11 -	Radioresistência à radiação ionizante	37
Figura 12 -	Fluxograma da Metodologia	39
Figura 13 -	Esquema do detector do AlphaGUARD	40
Figura 14 -	Esquema dos componentes do α Espec-222	41
Figura 15 -	Microscópio óptico	42
Figura 16 -	Floreira matriz	43
Figura 17 -	Irradiador ^{60}Co DEN/UFPE	44
Figura 18 -	Irradiador ^{60}Co DEN/UFPE	44
Figura 19 -	Câmara de radônio	46
Figura 20 -	Exposição das inflorescências na câmara de ^{222}Rn CRCN/NE	46
Figura 21 -	Sala de amostra DEN/UFPE	47
Figura 22 -	Representação da exposição da floreira na sala de amostra	48
Figura 23 -	Dimensões do ambiente simulado	49
Figura 24 -	Instalação da Alphaguard para dosimetria ativa	50
Figura 25 -	Monitoração de ^{222}Rn no simulador de ambiente natural	51
Figura 26 -	Instalação dos sistemas de dosimetria do ^{222}Rn	52
Figura 27 -	Fluxograma para ensaio por Trad – MCN	53
Figura 28 -	Estágio da inflorescência Jovem	54
Figura 29 -	Fluxograma de preparação das lâminas	55

Figura 30 -	Lâmina para avaliação dos micronúcleos na casa de vegetação, lâmina corada com carmim acético 2% com aumento de 40x	58
Figura 31 -	Lâmina para avaliação dos micronúcleos na área simulador de ambiente natural, corada com carmim acético 2% com aumento de 40x	59
Figura 32 -	Análise por microscopia óptica das influorescências irradiadas com dose de 5Gy por ^{60}Co corada com carmim acético 2% com aumento de 40x e 100x	61
Figura 33 -	Análise por microscopia óptica das influorescências irradiadas com dose de 10Gy por ^{60}Co corada com carmim acético 2% com aumento de 100x	62
Figura 34 -	Análise por microscopia óptica por exposição ao ^{222}Rn com objetiva de 40x e 100x corada com carmim acético 2%	64
Figura 35 -	Lâmina para avaliação dos micronúcleos na sala de amostras com objetiva de 100X corada com carmim acético 2%	65
Figura 36 -	Floreira da sala de amostras após 10 dias de exposição	65
Figura 37 -	Traços nucleares de um detector CR-39 exposto no período de 90 dias a um ambiente com ^{222}Rn após revelação (aumento de 100 vezes)	67
Figura 38 -	Análise por microscopia óptica após exposição ao simulador de ambiente natural, com objetiva de 100X corada com carmim acético 2%	67
Figura 39 -	Lâmina 90 dias após exposição ao simulador de ambiente natural, com objetiva de 100X corada com carmim acético 2%	68
Figura 40 -	Esquema gráfico da comparação dos números de micronúcleos por tétrade em cada grupo de exposição	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descendentes mais relevantes do radônio	23
Tabela 2 -	Dados de exposição da Tradescantia Pallida no irradiador de ^{60}Co	45
Tabela 3 -	Dados de leitura das lâminas para casa de vegetação	57
Tabela 4 -	Dados de leitura das lâminas para o ambiente simulado	59
Tabela 5 -	Dados de leitura das lâminas para o simulador de ambiente natural	60
Tabela 6 -	Dados de leitura das lâminas para a câmara de ^{222}Rn	62
Tabela 7 -	Características de exposição das inflorescências na câmara de ^{222}Rn	63
Tabela 8 -	Dados de leitura das lâminas para a câmara de ^{222}Rn . Grupo de exposição controlada	66
Tabela 9 -	Comparação do número de micronúcleos por tétrade em cada grupo de exposição	68
Tabela 10 -	Teste de Friedman para análise de variâncias	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	RADIOATIVIDADE AMBIENTAL	17
3.2	EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO IONIZANTE	19
3.3	RADÔNIO	21
3.3.1	Detectores de radônio	23
3.4	BIOINDICADORES	24
3.5	TRADESCANTIA PÁLLIDA	27
3.6	MICRONÚCLEOS	30
3.6.1	Ensaio TRAD-SHM	30
3.6.2	Ensaio TRAD-MCN	32
3.6.3	Irradiação por ⁶⁰Co e efeitos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	ESTRUTURAÇÃO DA METODOLOGIA	38
4.2	MEDIDAS DE ²²² Rn	39
4.2.1	Medidas ativas	39
4.2.2	Medidas passivas	40
4.3	GRUPO 01: GRUPO CONTROLE	43
4.4	GRUPO 02: EXPOSIÇÃO CONTROLADA	43
4.4.1	Exposição controlada à fonte antrópica - Irradiador ⁶⁰Co (DEN/UFPE)	43
4.4.2	Exposição controlada à fonte natural - Câmara de radônio (CRCN/NE)	45
4.5	GRUPO 03: EXPOSIÇÃO NÃO CONTROLADA	47
4.5.1	Sala de amostras (DEN/UFPE)	47
4.5.2	Simulador de ambiente natural	48
4.5.2.1	Medidas ativas – Alphaguard	50
4.5.2.2	Medidas Passivas CR-39	51

4.6	BIOENSAIO POR TRAD-MCN	53
4.6.1	Preparação do Fixador	53
4.6.2	Preparação do corante	54
4.6.3	Separação das Inflorescências	54
4.6.4	Confecção das Lâminas	55
4.6.5	Leitura das Lâminas	56
4.6.6	Análise Estatística	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5.1	GRUPO CONTROLE	58
5.1.1	Casa de vegetação	58
5.1.2	Simulador de ambiente natural	59
5.2	GRUPO DE EXPOSIÇÃO CONTROLADA	61
5.2.1	Exposição controlada à fonte antrópica - Irradiador ⁶⁰Co	61
5.2.2	Exposição controlada à fonte natural - Câmara de radônio (CRCN/NE)	63
5.3	GRUPO DE EXPOSIÇÃO NÃO CONTROLADA	65
5.3.1	Sala de amostras (DEN/UFPE)	65
5.3.2	Simulador de ambiente natural	66
5.3.2.1	Medidas Passivas com CR-39	66
5.3.2.2	Exposição da Tradescantia pallida	67
5.3.3	Análise estatísticas dos resultados	71
6	CONCLUSÕES	72
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O homem e o meio ambiente sempre estiveram sujeitos a exposições às radiações ionizantes, seja originada de fontes antropogênicas para aplicações na medicina e indústria, por exemplo, ou por fontes naturais, encontradas no espaço (radiação cósmica), dos radionuclídeos presentes nos solos e rochas (radiação terrestre ou radionuclídeos primordiais) (L'ANNUNZIATA, 2012). A radioatividade natural é a maior contribuinte na dose média anual global de exposição dos indivíduos (UNSCEAR 2008).

Tem sido cada vez mais frequente a prática da monitoração dos níveis da radioatividade natural, a fim de minimizar possíveis riscos induzidos. Vários estudos de correlação de baixas doses de radiação e a frequência de mutações vem sendo desenvolvidos, como forma de estimar esses riscos (FROEHLICH, 2009).

É importante ressaltar que, dos 78,5% de participação das fontes naturais de radiação na radioatividade ambiental, aproximadamente 85% resultam dos radionuclídeos presentes na crosta terrestre (radionuclídeos primordiais). O complemento cabe aos radionuclídeos produzidos pela interação dos raios cósmicos com a atmosfera (radionuclídeos cosmogênicos), além dos próprios raios cósmicos.

Dentre os elementos radioativos naturais, o maior contribuinte na exposição dos indivíduos é o radônio (Rn), considerando que é encontrado em diferentes compartimentos do meio ambiente, rochas, solos, água e ar; é facilmente absorvido pelo organismo a partir da inalação por ser um gás, havendo possibilidade de deposição de seus descendentes no trato respiratório, e conseqüente probabilidade de desenvolvimento de câncer de pulmão (UNSCEAR, 2000).

A determinação da concentração de Rn no ar pode ser realizada a partir de métodos ativos ou passivos. A medida ativa ocorre pelo bombeamento do ar ambiente para dentro de câmaras, que possibilitam a passagem do gás e captação da radiação alfa pelos detectores. Nos métodos passivos, os detectores são dispostos ao ar livre, onde sofrem a influência do Rn. Esse tipo de monitoração leva alguns meses para obtenção de medidas precisas. Essas formas de detecção podem ser utilizadas para quantificação do ^{222}Rn ou em conjunto com sua progênie que também são emissores alfa (TOMMASINO, 1998; NASTRO *et al.*, 2018).

Como forma alternativas de monitoração, espécies de plantas vêm sendo estudadas como forma de monitorar o ambiente, as quais são denominados bioindicadores. Alterações morfológicas em plantas são sintomas usados na bioindicação, em função da facilidade do trabalho e baixa complexidade na identificação e avaliação das alterações, não sendo

necessária a atuação de laboratórios especializados. Indicadores morfológicos, para diferentes fatores de estresse e contaminantes, já foram testados, de forma que é possível realizar uma indicação em longo ou curto prazo, para concentrações baixas ou elevadas de poluentes ou de exposição à radiação (SANT'ANNA, 2003).

A utilização de um sistema bioindicador usando plantas vem apontando uma série de vantagens ao longo do tempo, principalmente em se tratando das plantas superiores, que são organismos eucarióticos cuja complexidade genética é similar à do homem em termos de quantidade total de DNA por núcleo, genes estruturais, organelas, morfologia cromossômica e outros fatores. As plantas são multicelulares com complexa organização sistêmica; possuem desenvolvimento embrionário, onde também ocorrem a determinação, a competência e a hereditariedade celular (SANT'ANNA, 2003; CONSTANTIN, 1982).

Desde 1913 são descritos experimentos com uso de bioindicadores. O primeiro citado na literatura foi a irradiação de uma *Vicia faba* (cebola) (BLACKWELL, 1959) em sequência, outras espécies foram utilizadas para avaliação da capacidade biomonitora, dentre essas, a *Tradescantia pallida* (RODRIGUES, 1999).

A *Tradescantia* é uma espécie de planta originária do México, de fácil adaptação ao clima subtropical do Brasil, e que se desenvolve o ano inteiro. Seu uso tem se tornado cada vez mais comum, devido a características intrínsecas como o tamanho relativamente pequeno e código genético composto por seis pares de cromossomos relativamente grandes, tornando-a uma excelente espécie para estudos citogenéticos (MA, 1982; GRANT, 1989).

A *Tradescantia* tem sido utilizada em bioensaios para avaliação de alterações genética através de ensaios com os seus micronúcleos. Tais toxidades podem ser expressas e extrapoladas para os seres humanos, pois a *Tradescantia* apresentou-se mais vantajosa quando comparados aos bioensaios com animais, além da eficácia comprovada em diversos estudos de biomonitoramento de radiação natural (RODRIGUES, 1997 *apud* MAZIVIERO, 2011).

Devido a significativa contribuição da radioatividade natural na irradiação do indivíduo e a necessidade de definição de formas de avaliação de radônio e descendentes (RnD) com baixo custo e eficientes, o presente estudo se fundamenta no uso da *Tradescantia* na avaliação do efeito genotóxico da exposição ao radônio e seus descendentes, ampliando o conhecimento do potencial citotóxico e mutagênico associados a exposição dos indivíduos ao radônio e seus descendentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O projeto tem como objetivo geral, avaliar os efeitos citogenéticos provocados na espécie *Tradescantia Pállida* por exposição ao radônio e progênie, a partir da análise quantitativa de seus micronúcleos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigação da sensibilidade da espécie aos efeitos do *background* (controle negativo).
2. Validação da metodologia TRAD-MNC por células-mãe de grão de pólen a partir da exposição controlada com ^{60}Co .
3. Avaliação da frequência de micronúcleo por tétrade nas células-mãe de grão de pólen de *Tradescantia pállida* por exposição controlada ao ^{222}Rn e seus descendentes.
4. Exposição de *Tradescantia pállida* com níveis de radônio conhecidos, simulando ambientes de convívio humano em áreas de elevado *background* radioativo. Avaliados através do ensaio de micronúcleo por tetrádes.
5. Correlação entre as frequências de micronúcleos por tétrade nas *Tradescantias* expostas ao ^{222}Rn e seus progênie com o grupo controle.

3 REVISÃO DE LITERATURA

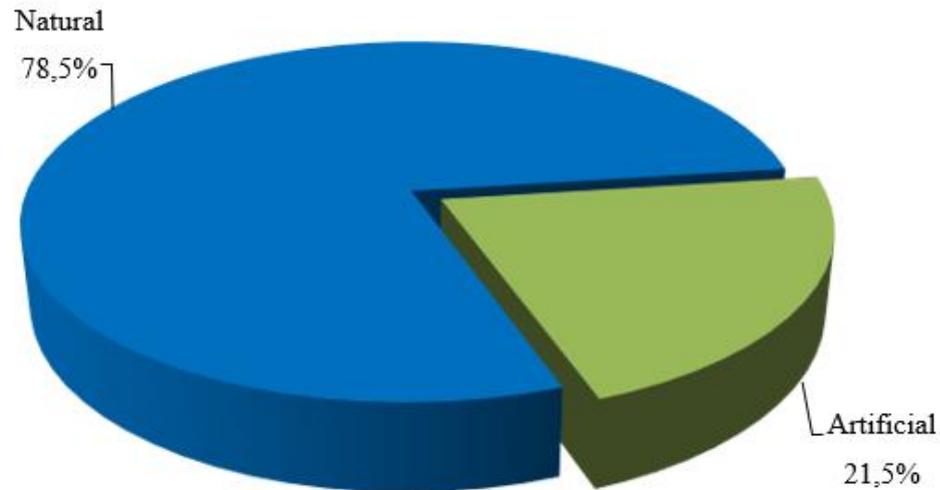
3.1 RADIOATIVIDADE AMBIENTAL

A Radioatividade encontra-se presente no planeta desde a sua formação, principalmente pelos radionuclídeos que constituem a crosta terrestre - os chamados NORM (do inglês *Naturally Occurring Radioactive Material*) e também pelas fontes cósmicas, o que resulta na exposição de todo e qualquer ser vivo à radiação ionizante. A este conjunto de radiações às quais os seres vivos se encontram expostos de maneira permanente, dá-se o nome de radiação de fundo ou do inglês “*background*” (WANG *et al.*, 2015).

Desde os primórdios da humanidade, antes da civilização humana a radiação ionizante está presente na vida do homem e do meio ambiente, podendo ser produzida de varias as formas entre elas artificialmente, a partir de atividades antrópicas com aplicação de reatores nucleares e teste de explosões nucleares, a exemplo dos testes realizados nos anos de 1952 a 1958 e de 1961 a 1962 que ocasionaram em exposição contínua até hoje, como também por fontes medicas. Tais exposições também podem ser geradas a partir de fontes naturais (UNSCEAR, 2008). Radionuclídeos naturais estão presentes na crosta terrestre desde sua origem. Elementos radioativos como urânio, tório e potássio são encontrados em rochas, solos, água, materiais de construção, ar e representam a maior parte da dose de radiação recebida pela população mundial, conforme detalhamento na Figura 1 (UNSCEAR, 1993; KUMAR *et al.*, 2008).

Os radionuclídeos naturais podem ser divididos entre os que ocorrem de forma isolada, como o ^{40}K e os que são componentes das principais séries de decaimento radioativo, com destaque para a série do ^{238}U e a série ^{232}Th , que assim como seus descendentes, entre os radionuclídeos primordiais aqueles de maior relevância são os pertencentes as séries citadas, no que diz respeito à exposição por radiação natural, pois apresentam meias-vidas físicas compatíveis com a idade terrestre, parâmetro físicos de alta importância na avaliação de materiais radioativos de ocorrência natural (EISENBUD *et al.*, 1997; PETTA; CAMPOS, 2011).

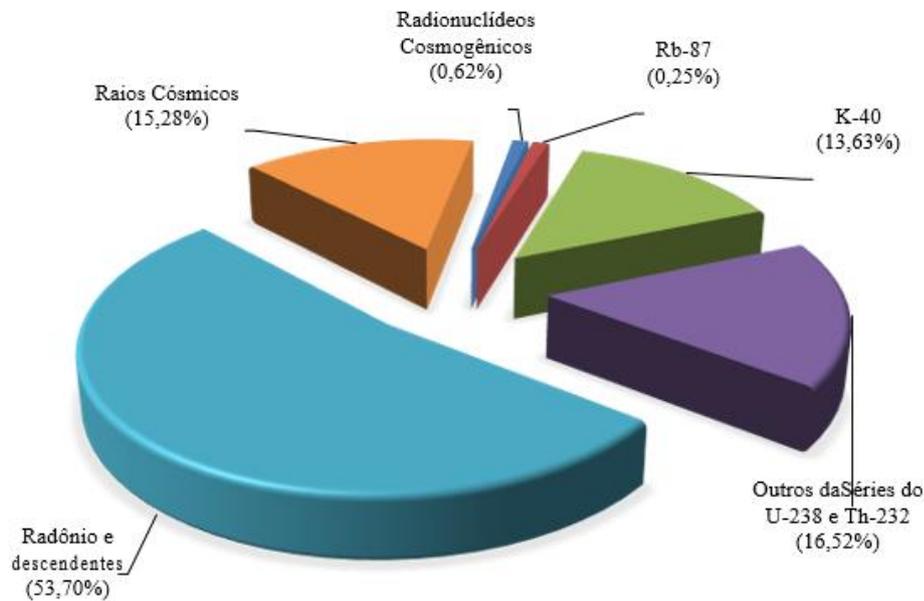
Figura 1 - Exposição do homem à radiação ionizante



Fonte: UNSCEAR (2014).

Cerca de 5/6 das doses efetivas individuais de radiação natural são recebidas pelo homem devido as fontes terrestres, a maioria sendo contaminação a radiação de forma interna. A menor contribuição se deve aos raios cósmicos, principalmente por contaminação a radiação de forma externa. Destaca-se na Figura 02 a participação do radônio e descendentes (54%), responsável por aproximadamente 2/3 da dose efetiva recebida pelo homem em consequência da inalação (MAZZILLI *et al.*, 2011, SILVA, 2014a), bem como os demais elementos das séries radioativas naturais do ^{238}U e do ^{232}Th (17%) com grande número de emissões radioativas e importância ambiental, além do ^{40}K (14%) (MAZZILLI *et al.*, 2011, SILVA, 2014a).

Figura 2 - Contribuição da dose efetiva derivada das fontes de radioatividade natural



Fonte: adaptado de UNSCEAR (2000).

Outros fatores que podem contribuir com a diferença de dose de radiação por indivíduos é a qualidade de vida relacionado a rotinas diárias como por exemplo, pessoas que trabalham em ambientes fechados, altitudes elevadas, bem como viagens de avião (IPEN, 2011). O solo é considerado uma das principais vias de transferências de radionuclídeos naturais, pois está presente em toda camada da crosta terrestre, é um recurso natural composto por matéria orgânica, água, ar e organismos (PETTA; *et al*, 2013).

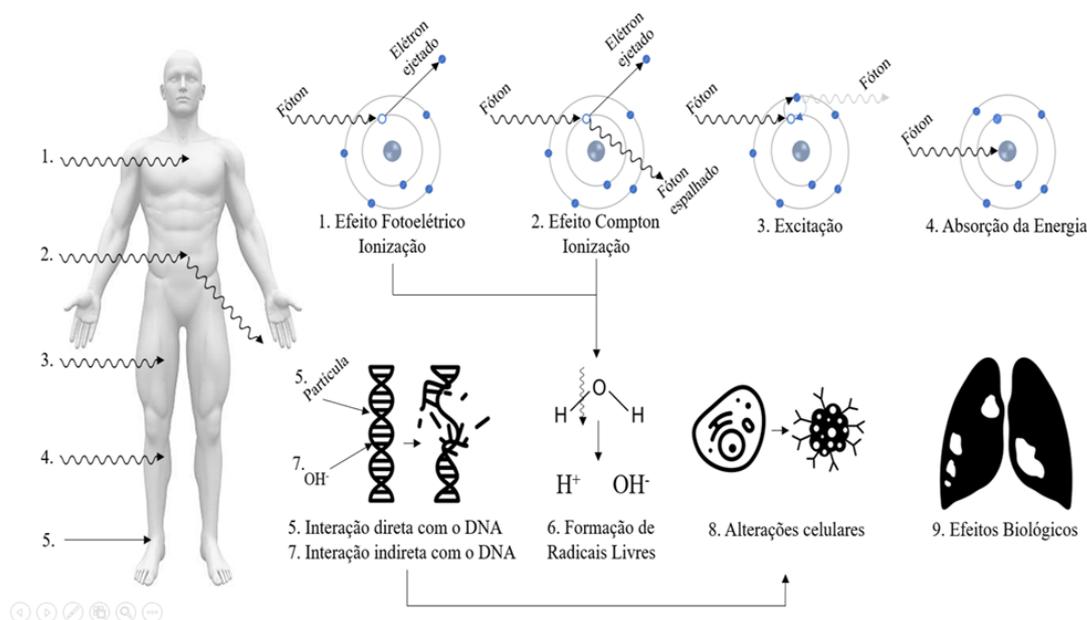
Dependendo da geologia local, alguns indivíduos podem sofrer maior exposição decorrente da inalação do radônio, pois representa mais da metade da exposição humana no que se refere às fontes naturais de radiação ionizante (UNSCER, 1988).

3.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO IONIZANTE

Toda radiação ionizante é capaz de causar morte ou mutação celular. O tipo, a dose e o tempo de exposição à radiação e o órgão ou célula irradiada são fatores que influenciam nesses efeitos. A gravidade do dano ao organismo depende essencialmente do fracionamento e da intensidade da dose absorvida. Normalmente esses efeitos têm início numa sequência originada desde a ionização dos átomos constituintes da matéria orgânica irradiada ou quebra direta das

moléculas, passando para uma fase química intermediária, na qual existe a interação dos radicais livres previamente formados, culminando nos efeitos biológicos. Salienta-se que, em muitos casos, a radiação ionizante causa apenas excitação do elétron que a absorveu (ATIX, 2008). A Figura 3 apresenta alguns dos principais efeitos da interação da radiação ionizante com a matéria.

Figura 3 - Sequência de efeitos que podem ser causados pelas radiações ionizantes



Fonte: CNEN (2003).

A sequência de alterações pode ser explicada da seguinte forma: o primeiro estágio tem uma duração muito pequena, logo após a absorção da radiação. Nesse estágio ocorre o fenômeno físico da ionização e da excitação de átomos do corpo humano. No segundo estágio, chamado físico-químico, as ligações químicas das moléculas são rompidas com a formação de radicais livres. O terceiro estágio tem uma duração de poucos segundos e é um estágio químico, no qual os radicais livres formados, que são altamente reativos, se ligam as moléculas importantes da célula, tais como as proteínas, as enzimas e até mesmo as moléculas de DNA, danificando-as. O quarto estágio ocorre quando surgem os efeitos bioquímicos e fisiológicos com alterações morfológicas e funcionais dos órgãos (RODRIGUES, 2011; OKUNO, 2013).

A manifestação dos efeitos biológicos pode ocorrer através do efeito determinístico e do efeito estocástico. O efeito determinístico tem uma clara relação entre a dose absorvida e o efeito causado no indivíduo, ou seja, a gravidade do efeito é diretamente proporcional à dose

absorvida. Existe um limiar de dose para o qual o efeito aconteça, cujo valor depende do tipo de radiação e do tecido irradiado, cujos efeitos são traduzidos no aparecimento de eritema cutâneo, indução de cataratas, perda de cabelo e indução de esterilidade (KATZ, 2000; PISCO, 2003).

Uma de suas principais consequências de doses elevadas à radiação ionizante é a morte celular em grande escala, pois se poucas células morrerem, o efeito pode não se apresentar no indivíduo, entretanto, se um número muito grande de células de um órgão entrar em apoptose, o seu funcionamento pode ser prejudicado (STONE *et al.*, 2003; TURNER, 2007). Acreditava-se que as reações teciduais eram consequências que surgiam imediatamente após à exposição à radiação, porém, estudos epidemiológicos dos sobreviventes das bombas atômicas lançadas pelos americanos no Japão começaram a mostrar evidências da existência de efeitos tardios que resultam de danos teciduais (OKUNO, 2013).

O câncer de pulmão é um dos efeitos estocásticos que pode ser provocado pela irradiação interna, principalmente, a partir das emissões alfa, provenientes do Radônio. É priorizada a pesquisa e concepção de formas de detecção do gás Radônio em ambientes internos com altos níveis de NORM, principalmente em regiões onde se encontram jazidas de urânio próximas de convívio humano (IEA,2003).

3.3 RADÔNIO

O radônio é um gás inerte, inodoro, insípido, sete vezes mais pesado que o ar (COUTINHO; MALHEIROS; PADILHA, 2009). Quando esse gás e seus produtos de decaimento são inalados, acabam aderindo ao tecido pulmonar, com exposição contínua à longo prazo contribuem para a etiologia do câncer de pulmão. Vários estudos mostram o surgimento de tumores pulmonares em virtude da inalação do radônio (FIELD *et al.*, 2001; KREIEBROCK *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002;).

O radônio pode estar presente no meio ambiente através de materiais de construção, água de abastecimento, solos adjacentes e no interior das habitações e ambientes de trabalho, caracterizando o aumento de dose de radiação natural em ambientes internos (TUNG; BURNETT; LAU, 2004).

De acordo com o Comitê Científico das Nações Unidas sobre os Efeitos da Radiação Atômica o radônio e os seus produtos de decaimento contribuem com cerca de $\frac{3}{4}$ da dose efetiva anual recebida pelo homem decorrente das fontes terrestres e com aproximadamente metade da

dose recebida em virtude de todas as fontes naturais. O decaimento do radônio no organismo é caracterizado pela inalação do elemento radioativo em ambientes fechados (UNSCEAR, 2008).

O radônio apresenta dois isótopos principais, o ^{222}Rn , produto de decaimento do ^{238}U , e o ^{220}Rn , também chamado de Torônio e que é produto de decaimento da série radioativa do ^{232}Th . Este último isótopo não contribui de forma significativa em termos de proteção radiológica, pois apresenta tempo de meia vida física de apenas 55,6 segundos. O ^{222}Rn , quando comparado com o isótopo ^{220}Rn , tem uma relevância radioecológica 20 vezes maior, contudo, as maiores doses registradas são provocadas pela progênie do ^{222}Rn (ICRP, 1993; MAZZILLI *et al.*, 2011).

Quando esse gás interage com o trato respiratório, pode provocar danos, derivados das interações de sua progênie de meia-vida curta e intermediária, que são os radioisótopos ^{218}Po , ^{214}Pb , ^{214}Bi , ^{214}Po , ^{210}Pb e o ^{210}Po , que se depositam no pulmão. Os descendentes do radônio são isótopos de metais pesados, conhecidos por apresentarem meia-vida biológica longa no organismo dos mamíferos, que se fixam facilmente aos aerossóis presentes na atmosfera e seu decaimento radioativo se dá por emissão de partículas alfa, beta, bem como os raios gama (IPEN; 2011).

O grau de exposição ao radônio aumenta de forma significativa em ambientes fechados. Nas zonas temperadas, a concentração de radônio no interior das moradias chega a ser oito vezes superior à existente no ambiente externo. Já no ambiente externo, no qual contém circulação de ar é elevada, os níveis de concentração são considerados relativamente baixos, devida à contínua dispersão na atmosfera. Os locais onde ocorrem maiores níveis são ambientes fechados, como por exemplo, em minas subterrâneas, interior das casas, edifícios onde a ventilação de ar seja comprometida. Quanto menos ventilada a moradia, maior será a concentração de radônio em seu interior (DURRANI, 2008).

As principais vias de exposição ao ^{222}Rn e sua progênie correspondem à inalação e à ingestão. Devido à exposição interna as radiações alfa, beta e gama proveniente dos descendentes, por exemplo, ^{218}Po , ^{214}Pb , ^{214}Bi e ^{214}Po observados na Tabela 1, que são incorporados após o decaimento de seu precursor, existe a possibilidade do desenvolvimento de efeitos estocásticos nos seres humanos (ICRP, 1991; ICRP, 1993).

Tabela 1 - Descendentes mais relevantes do radônio

Radionuclídeo	Tipo de Emissão	Energia (MeV)	Tempo de Meia Vida
^{218}Po	α	6,00	3,05 min
^{214}Po	α	7,69	164 μs
^{214}Pb	$\beta - \gamma$	1,03 - 0,29	26,8 min

Fonte: FIRESTONE (1999)

Do ponto de vista histórico, o radônio começou a ser descoberto no ano de 1896 - 1899, sua monitoração foi iniciada no século XVI, devida a correlação entre a inalação de radônio e o aparecimento de mineradores com doenças respiratórias, no caso o câncer de pulmão. A partir disso a monitoração da radiação ambiental passou a ser mais efetiva, e as preocupações crescentes tanto com doses ocupacionais quanto com doses nas residências passaram a ser estudadas, o que permitiu a determinação de limites de exposição (TUNG; BURNETT; LAU, 2004). Portanto, estudos voltados aos bioindicadores de exposição às radiações ionizantes são importantes para se avaliar os efeitos biológicos radioinduzidos do radônio.

3.3.1 Detectores de radônio

A determinação da concentração de Rn no ar pode ser realizada a partir de métodos ativos ou passivos. A detecção ativa ocorre pelo bombeamento do ar ambiente para dentro de câmaras, que possibilitam a passagem do gás e captação da radiação alfa pelos detectores. Nos métodos passivos, os detectores são dispostos ao ar livre, onde sofrem a influência do gás Rn, geralmente por alguns meses. Essas formas de detecção podem ser utilizadas para quantificação individual do ^{222}Rn ou em conjunto com seus descendentes, que também são emissores alfa (TOMMASINO, 1998; NASTRO *et al.*, 2018).

Dentre os medidores ativos, o AlphaGUARD, que é uma câmara de ionização, é amplamente utilizado, pois é um detector prático com alta capacidade de armazenamento de dados, elevada eficiência de detecção e resposta rápida (FARIAS, 2016). É composto por uma câmara de ionização, cujo funcionamento consiste na inserção, por fluxo de ar forçado, do gás radônio para dentro do equipamento, induzindo a ionização das partículas de ar presentes no equipamento, possibilitando assim, a medição da concentração de atividade de ^{222}Rn (FARIAS, 2016). Acoplado a este instrumento, existe um sistema de filtros para bloqueio dos seus

descendentes: ^{218}Po , ^{214}Po , ^{214}Pb e ^{214}Bi , que são metais, garantido a eficiência de medição do ^{222}Rn (GEORGE, 1996).

As medidas passivas de ^{222}Rn podem ser realizadas a partir do uso de carvão ativado ou detectores de traços nucleares de estado sólido. O carvão ativado adsorve o gás Rn presente no ambiente e posteriormente, pode ser analisado por espectrometria gama, onde serão determinadas as concentrações do ^{214}Pb e ^{214}Bi , que servirão como parâmetros para quantificar o ^{222}Rn (COHEN *et al.*, 1983).

Já os detectores de traços nucleares de estado sólido, SSNTD (solid state nuclear trace detectors) possui diversas vantagens, tornando-os amplamente utilizados mundialmente, dentre elas destacam-se: a confecção com materiais de baixo custo possibilita o registro das interações nucleares por longos períodos de tempo, apresenta geometria pequena e robusta. Desta forma, são considerados excelentes detectores para uso em campo, em ambientes úmidos e com temperaturas variadas para medidas por longos períodos de tempo (DURRANI, 2008).

O detector de traços nucleares de estado sólido do tipo CR-39 (Columbia Resin), em carbonato de polialildiglicol, tem sido utilizado atualmente em muitos estudos que visam a monitoração passiva do Rn e seus descendentes, pois é considerado uma das formas mais baratas de detecção alfa, alta eficiência de detecção e fácil composição (ASKARI *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2017; NASTRO *et al.*, 2018; FROMM *et al.*, 2019).

No CR-39, apenas partículas carregadas com alta transferência linear de energia (LET) podem criar rastros quando ele sofre interação com a radiação alfa, é marcado por minúsculos traços, que podem se tornar visíveis a partir de um processamento químico. A imagem dos traços pode ser avaliada em microscópios ópticos com sistemas de captura de imagens e processamento, de forma a possibilitar determinar a concentração de Rn e de seus descendentes (NASTRO *et al.*, 2018).

3.4 BIOINDICADORES

O termo bioindicador era aplicado na medição interna do organismo, em função das modificações de atividade enzimática em seus mais de 20 produtos (urina, fezes etc.). Com o passar do tempo observou-se que não se tratava apenas de modificações enzimáticas, mas sim, das informações obtidas observando do próprio meio ambiente, concretizando modelos de proteção dos seres vivos aos possíveis efeitos dos poluentes e material radioativo (VAN DER OST *et al.*, 2003).

Atualmente os bioindicadores representam mecanismos que proporcionam a identificação de alterações de parâmetros físicos, químicos e biológicos. Portanto, qualquer medida extraída de um organismo biológico originado a partir da interação com um agente tóxico e/ou radioativo, pode ser classificado de bioindicador (HACON, 2003).

A escolha de um bioindicador está associada à sua sensibilidade ou tolerância aos parâmetros e variáveis de contaminação. Indicadores biológicos integram as condições ambientais durante todo seu ciclo vital, tornando eficiente a avaliação biológica da exposição aguda ou crônica por diferentes elementos, portanto, se mostram eficientes na evidência de impactos ambientais (BUSS *et al.*, 2003). Os bioindicadores podem ser divididos em três classes:

Bioindicadores de Exposição: são baseados nas características farmacodinâmicas e físico-químicas do composto do organismo, observando a presença e interação do xenobiótico e sua interação com moléculas e células alvo (SCHLENK, 1999; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Bioindicadores de Efeitos: fundamentados na avaliação da resposta aos danos a nível molecular (bioquímico fisiológico e histológico), relacionado ao sistema ecológico (SCHLENK, 1999).

Bioindicadores de susceptibilidade: que apresentam a habilidade de certos organismos responderem a mudanças de um determinado agente agressor, seja por fatores genéticos (mutação) ou bioquímicos (alteram a susceptibilidade do organismo) (DEN BESTEN, 1998, SCHLENK, 1999, VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Com o meio ambiente sendo impactado por agentes nocivos, a necessidade de indicadores de qualidade do meio ambiente cada vez mais se faz necessário, afim de controlar e estabelecer padrões de qualidade da água, ar e solo (HOUK, 1992; SALDIVA *et al.*, 2019).

A avaliação do meio ambiente por meio dos bioindicadores é importante e permite mensurar o risco ambiental, com monitoramento em grandes áreas, por longos períodos, com avaliação de agentes químicos, físicos e radiológicos com diferentes concentrações, sendo práticas vantajosas pelo baixo custo e eficácia nos resultados em grandes áreas do monitoramento (SALDIVA *et al.*, 2019).

As plantas são consideradas excelentes bioindicadores, pois além do baixo custo, possuem uma alta sensibilidade e eficiência nas respostas aos danos celulares (GUIMARÃES *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2001). Para que os ensaios sejam considerados válidos e confiáveis, as espécies bioindicadoras devem seguir etapas definidas conforme descreveu Klumpp e colaboradores (2001), cujo procedimento pode ser visualizado na Figura 4.

Figura 4 - Esquema de biomonitoramento de plantas bioindicadoras



Fonte: adaptada de Klumpp *et al.*, (2001).

Bioensaios com plantas são adequados porque elas funcionam como monitores ambientais e, portanto, sensores de risco para o meio ambiente e população. A maioria dos ensaios com plantas vêm sendo promovidos pelo Programa Internacional de Segurança Química, IPCS (International Programme on Chemical Safety), juntamente com o Programa Ambiental das Nações Unidas, UNEP (United Nations Environment Programme), a Organização Internacional do Trabalho, ILO (International Labour Organization) e a Organização Mundial de Saúde do Trabalho, WHO (World Health Organization). Atualmente, são usados também pelo Programa Internacional de Bioensaios com Plantas, IPPB (International Programme of Bioassay with Plants), sob a supervisão da UNEP (Grant, 1994; Grant, 1998; Gopalan, 1999).

A utilização de plantas como bioindicadores tem tido, cada vez mais, um papel importante nas pesquisas relacionadas ao controle de poluentes atmosféricos e à presença de radionuclídeos naturais ou artificiais (SALDIVA *et al.*, 2019). Em regiões de clima tropical, o biomonitoramento com o emprego de plantas ainda é pouco utilizado, ao contrário dos países desenvolvidos, onde essa metodologia é vista como uma forma rápida e segura de se obter informações e ainda de prever os riscos para humanidade (HACON, 2003; CARVALHO, 2005).

Vários temas sobre a qualidade do meio ambiental, vem sendo discutidos em âmbito global, a fim de propiciar uma melhor qualidade de vida e segurança para todos os seres vivos. Com essas discussões, podem-se estabelecer leis e limites do ambiente biofísico, a fim de preservar a segurança do planeta (MANNING, 1998).

É importante que o desenvolvimento dos bioindicadores siga metodologias e adaptações de acordo com cada região, pois variações climáticas podem resultar em diferentes resultados de acordo com cada região. O estado ou município irá estabelecer seus maiores danos ao ecossistema, e usará os bioindicadores, por sua vez, para prever ou prevenir alguns malefícios ao meio ambiente (COUTINHO; MALHEIROS; PADILHA, 2009).

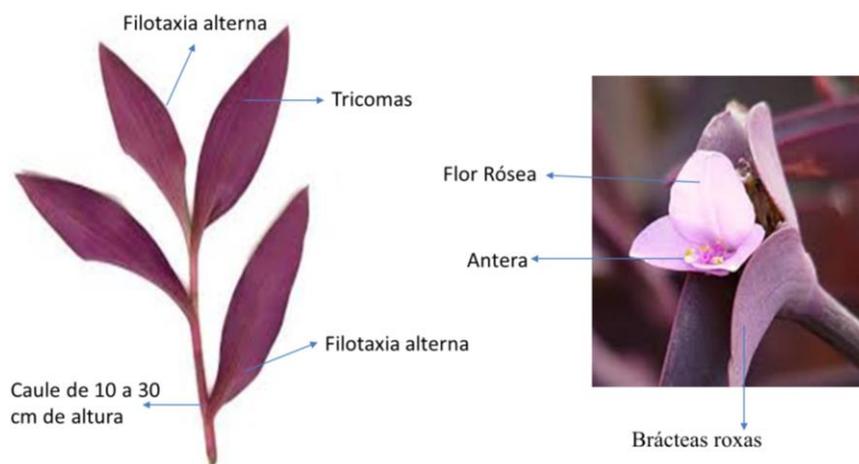
Com o passar dos anos, a *Tradescantia* passou a ser utilizada como bioindicador, em função de algumas características, como: a fácil adaptação ao meio ambiente, a resistência a climas subtropicais, o contínuo desenvolvimento durante o ano, adaptação as áreas externas, incluindo as áreas controladas, além de ser encontrada facilmente em todo o planeta. (CARVALHO, 2005).

3.5 TRADESCANTIA PÁLLIDA

O gênero da *Tradescantia* pertence à família Commelinaceae e compreende cerca de 500 espécies, pertencentes ao grupo de plantas superiores, que são encontradas principalmente em áreas subtropicais e tropicais, a exemplo do Brasil. A espécie em estudo, denominada *Tradescantia pallida purpúrea*, também conhecida pelos nomes populares de trapoeraba-roxa, coração-roxo, trapoerabão, ou simplesmente, trapoeraba, tem uma fácil adaptação, podendo ser encontrada em todo o território brasileiro durante todo o ano, não necessitando de um clima específico, pois tem um alto poder de adaptação (CARVALHO, 2005).

A morfologia vegetal da espécie é composta por uma estrutura simples. Células da ponta da raiz até o tubo polínico em desenvolvimento fornecem material excelente para estudos citogenéticos (MA; GRANT, 1982). Na Figura 5 foi detalhada a morfologia vegetal da planta.

Figura 5 - Morfologia vegetal da *Tradescantia pallida*



Fonte: A autora (2022).

O estudo com plantas superiores iniciou-se por volta da década de 70, com uma série de testes para avaliação de genotoxicidade, onde foram utilizadas diferentes espécies com a finalidade de monitorar os efeitos no meio ambiente (M. MISIK, *et al.*, 2011). Os estudos mostram que, para avaliação da genotoxicidade, o clone #4430 que corresponde a uma espécie híbrida estéril entre a *Tradescantia hirsutiflora* e *Tradescantia subacaulis*, apresentou maior sensibilidade a diferentes agentes agressores como por exemplo, a poluição do ar, água solo, pois a esterilidade certifica a homogeneidade genética do clone na ausência de efeitos mutagênicos (MISIK *et al.*, 2011; WHITE; CLAXTON, 2004 *apud* MAZIVIERO, 2011). O clone #4430 pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Inflorescência da *Tradescantia* clone #4430



Fonte: MISIK, *et al.*, (2011).

Algumas variações da *Tradescantia* já são conhecidas pelo seu potencial de expressar um biomonitoramento. Após alguns experimentos, pesquisadores verificaram que a espécie da

Tradescantia Pallida seria muito mais resistente no Brasil, devido a fácil adaptação ao clima tropical (LONGHI, 2020; CARVALHO, 2005).

Outras espécies de *Tradescantia* foram utilizadas para testes, como a subespécie reflexa, porém, como este tipo pode chegar a cerca de 2 metros de altura, o custo se tornou muito elevado, além do longo tempo para obter a espécie adulta. Na década de 90, vários pesquisadores brasileiros iniciaram as pesquisas com a espécie de *Tradescantia pallida* para monitoramento ambiental, envolvendo atividades de mutações genéticas, ocasionadas por agentes químicos originados pelo ar, solo, água ou até mesmo radiações ionizantes (MISÚK, et al., 2011).

Em termos específicos, para análise dos efeitos das radiações ionizantes, e consequente obtenção de um limiar de dose, experimentos com mamíferos deveriam ser avaliados para que os resultados sejam extrapolados para os seres humanos. Contudo, levando em consideração a semelhança de pares cromossômicos do código genético da *Tradescantia Pallida* com mamíferos, tais efeitos da radiação podem causar lesões transitórias, ou permanentes chegando a morte celular, semelhante aos efeitos a células humanas, alguns estudos envolvendo a estimativa de dano causado pela radiação em seres humanos podem ser conduzidos com eficácia (CARVALHO, 2005).

Dentre as vantagens para estudo das diferentes características genéticas, a espécie de planta *Tradescantia pallida* destaca-se pela baixa estatura, podendo chegar até 25 cm de altura, pelo seu vasto código genético, que contém cerca de seis pares de cromossomos, facilitando a leitura microscópica e a interpretação de mutações genéticas de forma qualitativa e quantitativa na avaliação das contaminações (CARVALHO, 2005).

O elevado nível da radioatividade ambiental, pode provocar aumento do risco de mutações genéticas em futuras gerações, a partir de efeitos radioinduzidos, o que maximiza a necessidade de definir sistemas que correlacionem a resposta ao efeito radioinduzido, possibilitando a estimativa de riscos (CARVALHO, 2005).

Alguns métodos, de diversas naturezas foram desenvolvidos para avaliação de níveis de radiação natural, dentre esses, o estudo do radônio, porém os métodos não foram satisfatórios porque os procedimentos não levam em conta as baixas doses de radiação presentes no meio ambiente (GOLDFARB et al., 1998). Um dos métodos bastante aceito foi o uso da *Tradescantia pallida* que vem mostrando eficácia como indicadores de mutações radioinduzidas, a partir de duas formas de ensaios: teste da mutação pelo estaminal da *Tradescantia* (Trad- SHM) e teste de micronúcleos (Trad- MCN) para fins de detecção de efeitos mutagênicos (LONGHI, 2020).

3.6 MICRONÚCLEOS

3.6.1 Ensaio TRAD-SHM

O ensaio da mutação em pelo estaminal (Trad-SHM) baseia-se em mutação pontual (mitótica) na qual é suprimida a expressão do caráter azul dominante em flores de plantas heterozigotas, resultando no aparecimento da cor rosa recessiva (NAYAR; SPARROW, 1967; MERICLE; MERICLE, 1967; MERICLE; MERICLE, 1971; EMMERLING-THOMPSON; NAWROCKY, 1982;).

Nos estudos iniciais para avaliação dos efeitos genotóxicos e citotóxicos, SPARROW, 1967 utilizou como agente agressor a radiação ionizante, para que a planta suportasse algumas doses, foi confeccionado um clone de *Tradescantia*. A planta, ao ser exposta, respondia de várias formas, como por exemplo, mudança de cor nas flores, porém algumas plantas, dependendo da dose, chegavam a morrer. Até se estabelecer um limiar de dose aceitável para a espécie, ocorreram vários efeitos genotóxico, que foram caracterizados como expressão de células gigantes, duplas ou triplas, bifurcação e outras anomalias de crescimento juntamente com a perda da integridade reprodutiva das células dos pelos, como indicadores de genotoxicidade (NAYAR; SPARROW, 1967).

Essa empregabilidade do estudo Tra-SHM com o agente agressor, neste caso a radiação ionizante, foi bastante utilizado para monitoração de usinas nucleares no Japão (ICHIKAWA, 1993). No estudo, foi constatado que, de acordo com a corrente de ar e com o período efetivo de funcionamento da usina, foi possível verificar o aumento de mutações nos micronúcleos da *Tradescantia* (CEBULSKA – WASILEWSKA, 1992). Com a contaminação de Cracóvia pela explosão do reator nuclear de Chernobyl, observaram-se frequências de mutações em Trad-SHM, tendo esse acidente ocorrido em uma distância de cerca de 700 km. Incrementos similares na taxa de mutação foram também notificados de maio a junho de 1986 no Japão (ICHIKAWA, *et al.*, 1996).

Com o alto índice de dose de radiação ionizante no ar, pode-se verificar a taxa de mutações espontâneas registradas em um período de 10 anos (1982 a 1992). Com isso foi criada uma padronização de ensaio Tra-SHM em relação a variações externas, como: temperatura, umidade, dose, dentre outras variáveis de experimentação (UNDERBRINK; SPARROW, 1974; UNDERBRINK *et al.*, 1975a; UNDERBRINK *et al.*, 1975b).

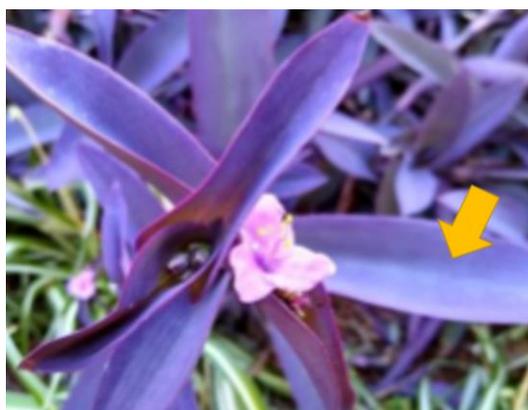
As lesões de DNA não ocorrem apenas com agentes agressores de radiação ionizante. Pois independente da reação química ou física pode ocorrer prejuízo às células, tais como:

duplicação do DNA e a transcrição gênica, podendo ocorrer aberrações cromossômicas, mutações, até levar a morte celular. Tais lesões, podem chegar a levar a apoptose celular. Danos permanentes no material genético um potencial altíssimo para tumores se comparados a células dos outros seres vivos, em específico as dos mamíferos por meio de efeitos determinísticos e estocásticos.

Existem vários fatores que podem ocasionar, de forma direta ou indireta, lesões ao material genético, e por sua vez, produzir tumores em seres vivos, cujos esses agentes são comumente conhecidos como genotóxico ou carcinogênicos. O crescente aparecimento desses fatores no meio ambiente, tanto no rural, industrial, urbano, vem mostrando cada vez mais a importância da pesquisa e utilização de bioindicadores, pois com a detecção desses fatores e prováveis efeitos, pode-se evitar riscos e prejuízos a vida humana, vegetal e animal (COSTA; MENK, 2000).

Com a análise do ensaio Trad – SHM ocorre ação direta da ativação dos agentes pro mutagênicos e agentes mutagênicos (GICHNER *et al.*, 1980). Benzo-a-pireno, atrazina e vários compostos se demonstraram mutagênicos quando testados sem tratamento prévio com frações microsomais, demonstrando a fragilidade das células em nível dos cromossomos (VELEMINSKY; GICHNER, 1998). O ensaio ocorre pela confecção de lâminas extraídas do pelo estaminal da *Tradescantia*. Na Figura 9 pode-se observar o pelo estaminal da *Tradescantia pallida*.

Figura 7 - Pêlo do estame da *Tradescantia*



Fonte: adaptada LONGHI (2020).

O ensaio Trad-SHM não foi muito bem aceito quando se tratava do agente agressor radiação ionizante, pois os raios-x suprimiam a ativação de micronúcleos (RODRIGUES, 1999). Neste teste, não foi observada a mutagenicidade da radiação ionizante e efeitos químicos,

porém, a sensibilidade se tornou maior quando analisada por Trad-MCN. A pesquisa com maior contribuição utilizada com o ensaio de TRAD-SHM foi uma série de estudos, realizados em laboratórios móveis, avaliando a qualidade do ar em cidades dos EUA (SCHAIRER,1979; SCHAIRER; SAUTKULIS,1982; SCHAIRER *et al.*,1982; SCHAIRER *et al.*, 1979; SCHAIRER *et al.*, 1983). Concluiu-se nestes estudos que os efeitos mutagênicos apresentavam correlação direta com a poluição do ar (LOWER *et al.*, 1985; TANO, 1989).

O presente estudo utilizou o método de ensaio Trad-MCN, devida a comprovação científica de sensibilidade ao agente agressor por radiação ionizante, especificamente Radônio e seus descendentes. A avaliação de micronúcleos expressou o dano sofrido por mutações genéticas.

3.6.2 Ensaio TRAD-MCN

A partir de 1960, estudos com plantas foram iniciados para a avaliação dos efeitos genotóxicos causados por diferentes agentes tóxicos e radioativo no ar e solo, visando o biomonitoramento, os estudos apresentados demonstravam lesões sistemáticas em células chamadas micronúcleos (SCHAIRER, 1978; MA, 1981; GRANT, 1982).

Os micronúcleos por sua vez, são originários de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que acabam por não completar a migração anafásica da divisão celular. Os agentes mutagênicos ocorrem em pequenas porções contendo o material genético, que sofrem lesões ocasionadas por fatores externos contaminantes, e não conseguem ser reparados durante a meiose (BOSCOLLI BARBOSA, 2013).

Dentre as espécies de plantas superiores para o uso no biomonitoramento e ensaios de micronúcleos, o gênero *Tradescantia* passou a ser utilizado para avaliação de células e aberrações cromossômicas, o que possibilitou aplicação na área de citogenética (MA *et al.*, 1995; COTELLE *et al.*, 1999; MINOUFLET *et al.*, 2003; MONARC *et al.*, 2005).

O teste para avaliação dos micronúcleos utilizando a espécie de *Tradescantia* (TMN-TRAD) é um dos ensaios frequentemente utilizados para detecções de efeitos clastogênicos ou aneugênicos em plantas superiores. Ao longo do tempo foram testados mais de 160 agentes contaminantes presentes no ambiente por meio do TMN-TRAD (BOSCOLLI BARBOSA, 2013).

Os ensaios de micronúcleos com a espécie de *Tradescantia* foram desenvolvidos com uma série de testes e com várias exposições aos agentes contaminantes. Tais agentes podendo ser a água, ar e solo contaminados a planta passou por análises em seus micronúcleos por

tétrades estagio que é capaz de informar lesões a nível de DNA. Esses ensaios se tornam cada vez mais vantajosos devido ao seu baixo custo, e vem sendo utilizados com alta frequência em países em desenvolvimento, aumentando o interesse de várias pesquisas correlacionadas com a *Tradescantia* como bioindicador (GRANT, 1994; BOSCOLLI BARBOSA, 2013; HOLLAND *et al.*, 2008;).

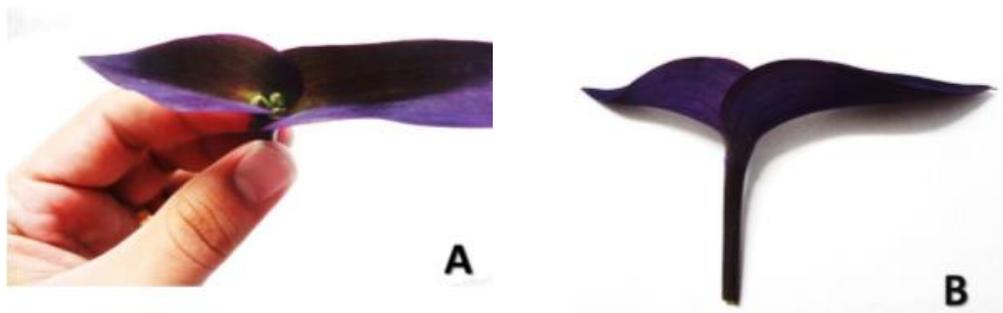
Os bioensaios para avaliação dos efeitos genotóxicos ocorreram a partir da detecção de danos em seu processo de divisão celular. Steinitz, Ma e colaboradores em 1944, desenvolveram o ensaio do micronúcleo na tétrade (Trad-MCN) no Laboratório Nacional de Brookhaven (STEINITZ, 1944; MA *et al.*, 1978). O ensaio demonstrou ser altamente eficiente com uma boa sensibilidade, dada à especificidade de ser necessária uma dose muito menor para produzir os micronúcleos, quando comparada a do ensaio envolvendo a mutação dos pelos estaminais (UNDERBRINK *et al.*, 1973b).

A avaliação dos micronúcleos e sua comparação com células saudáveis foi proposto por Maia (1981). No início, foram utilizados para estudo os estames de *Tradescantia*, sendo na sequência, observada que a avaliação das células em formato de tétrades era cerca de 30 vezes maior e mais volumosa que outras células da planta (SCHAIRER, 1978; MA, 1981; GRANT, 1982).

A Figura 7A apresenta a fase de inflorescência, onde são observados os efeitos clastogênicos que ocorrem em qualquer etapa de divisão celular ou em cromossomos inteiros. O efeito aneugênico só deverá ocorrer nas fases de meiose I ou meiose II (BOSCOLLI BARBOSA, 2013).

Na avaliação dos micronúcleos, pode-se verificar ocorrência de mutações com ação clastogênica ou aneugênica, sua visualização ocorre no citoplasma interfásico e não se incorpora ao núcleo e possui cerca de 1/5 a 1/3 do tamanho do núcleo, adquirindo uma coloração vermelha (HOLLAND *et al.*, 2008).

Figura 8 - Inflorescência jovem



Inflorescência em estágio intermediário.

Brácteas, protegendo a inflorescência.

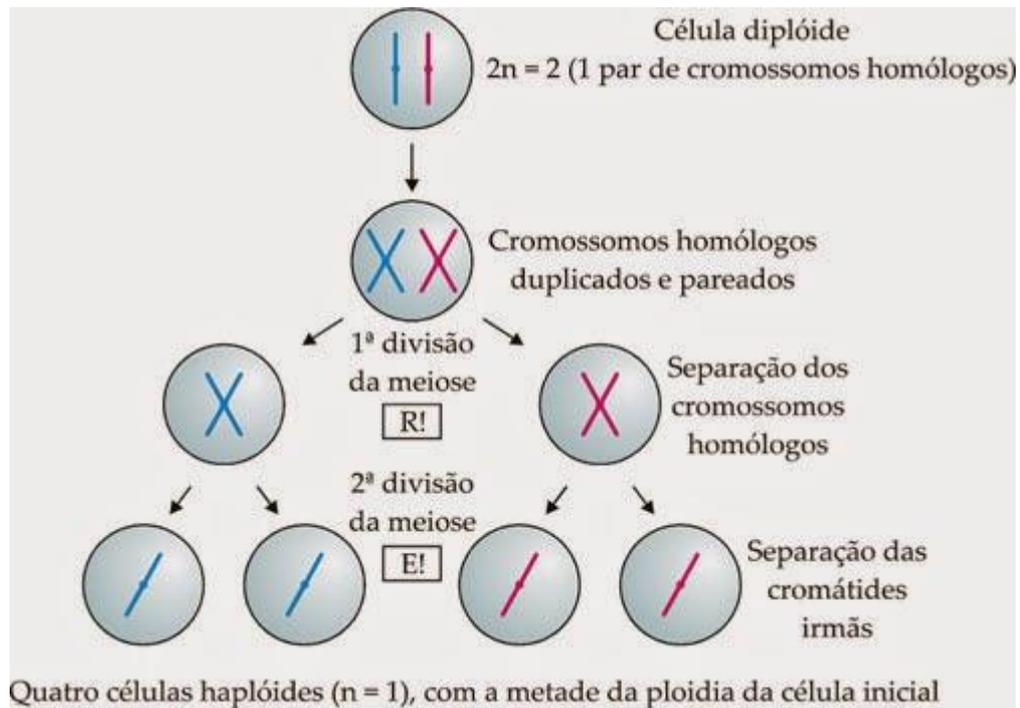
Fonte: adaptada BOSCOLLI BARBOSA (2013).

Alguns estudos publicados mostram a veracidade de resultados encontrados com ensaios de micronúcleos da *Tradescantia*. O mesmo oferece um sistema sensível e de fácil manuseio para avaliação de toxicidade genética, condições indispensáveis na investigação da monitoração ambiental (GRANT, 1994; RODRIGUES, 1999; HOLLAND *et al.*, 2008; BOSCOLLI BARBOSA, 2013).

O teste para contagem de micronúcleo em *Tradescantia* se baseia na apresentação de pequenos fragmentos de núcleo produzidos como resultado da fragmentação de cromossomos das tétrades dos micrósporos de *Tradescantia* (MA, 1981, RODRIGUES *et al.*, 1996).

A formação do grão de pólen nas plantas depende da formação de micrósporos, produzidos por meiose, processo de divisão celular reducional com relação ao número de cromossomos da espécie, no qual uma célula diplóide origina quatro células haplóides (a partir de duas divisões nucleares sequenciais, meiose I e II). A meiose I representa a preparação para a divisão celular, sendo que, em sua fase de prófase, os cromossomos homólogos emparelham-se, formando os bivalentes. Seguem-se as etapas da meiose I, promovendo a separação dos cromossomos homólogos. Na meiose II, segunda divisão celular, as cromátides irmãs alinham-se no plano equatorial da célula e se separam, movendo-se para pólos opostos durante a anáfase, seguida da formação de novos envoltórios nucleares, reorganização dos núcleos, assim como da formação de novas paredes celulares, constituindo as novas células haplóides (RAVEN *et al.*, 2007, FERREIRA, 2008). Pode-se observar na figura 9

Figura 9 - Divisão celular

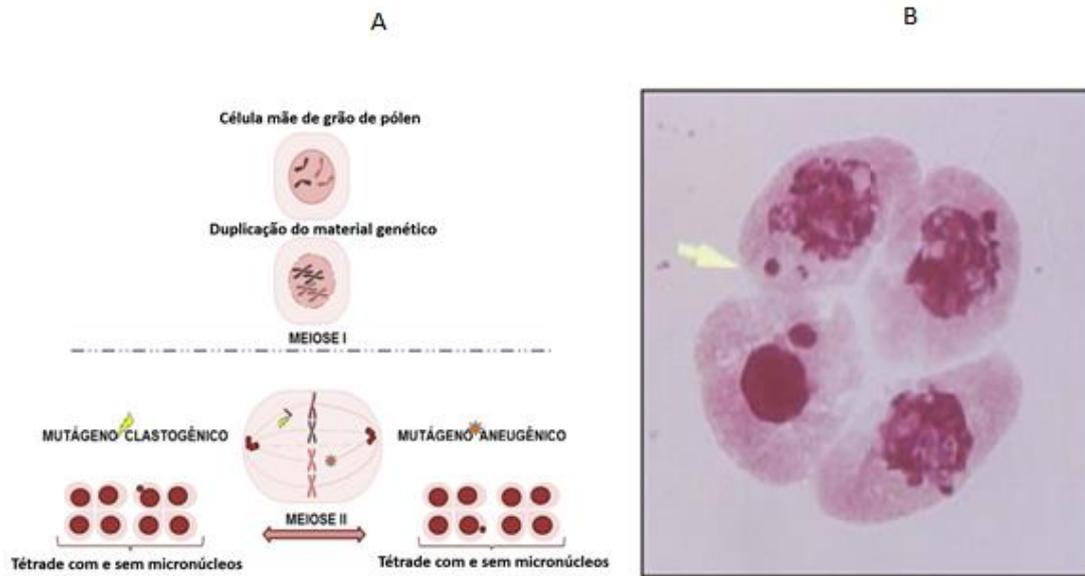


Fonte: RAVEN (2007).

O início da prófase I é a fase de maior sensibilidade aos agentes mutagênicos, e o estudo da formação de micrósporos possibilita, então, a análise para detecção dos micronúcleos em uma grande população de células na mesma fase da meiose. Na prática, isso é conseguido através da utilização de inflorescências jovens de *Tradescantia* (MA, 1982).

A Figura 10A ilustra os estágios da divisão celular das células diplóides na formação dos micrósporos em *Tradescantia*, com a formação de micronúcleo. A coloração do núcleo da planta é semelhante à coloração dos micronúcleos, por isso é necessário bastante atenção na hora da análise (RODRIGUES, 1999). Na Figura 10-B é possível observar o processo de divisão celular, evidenciando uma tetráde com a formação de micronúcleo. Tais efeitos mutagênicos ocorrem após a exposição da célula aos agentes nocivos.

Figura 10 - Diagrama de formação de micronúcleos em tétrades de *Tradescantia* (A) e microscopia óptica com visualização de micronúcleo (seta) em (B)



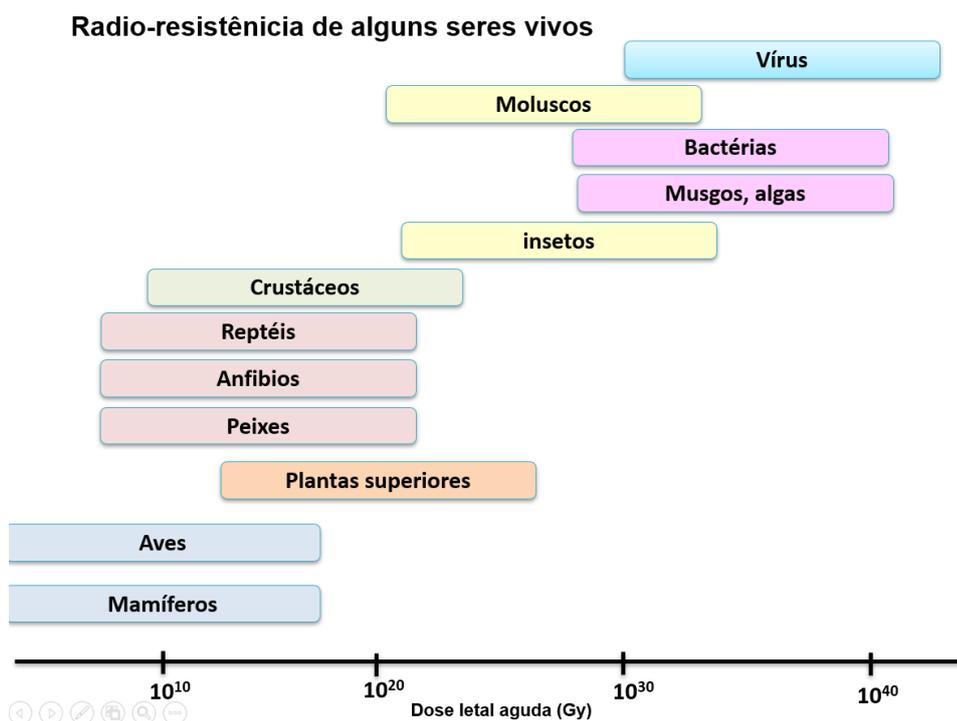
Fonte: BOSCOLLI BARBOSA (2013); CARVALHO (2005).

3.6.3 Irradiação por ^{60}Co e efeitos

Os raios gama são radiações eletromagnéticas, com alto poder de penetração. Em específico, os raios gama provenientes do ^{60}Co possuem energia média de 1,25MeV e poder de penetração superior a 50 cm. O Cobalto-60 (Co-60), o mais utilizado em irradiadores, emitem um fóton de 1170 KeV e outro de 1330, com média de 1250 KeV (36) (CALVO, 2005; CARVALHO, 2008). A radiação gama é capaz de produzir diversos efeitos biológicos, no entanto, esses efeitos são determinados por alguns fatores, como, por exemplo, o tipo de tecido que sofre a irradiação, o tempo de exposição e a intensidade da radiação (TEIXEIRA, 2009).

Quando a radiação gama interage com as moléculas presentes nos tecidos pode-se arrancar elétrons, formando íons. Em alguns casos, as ligações químicas podem ser rompidas, afetando o processo de divisão celular, podendo levar a mutações genéticas e até morte. As consequências decorrentes da exposição à radiação estão relacionadas a radiorresistência do organismo irradiado e a dose letal de cada ser vivo, conforme pode ser visto na Figura 11.

Figura 11 - Radioresistência à radiação ionizante



Fonte: TEIXEIRA (2002)

Devido à grande variedade de aplicações da radiação gama, os irradiadores de ^{60}Co têm foco voltado para pesquisas. Considerando o grande número de irradiadores, tamanhos e formas, os mesmos podem ser divididos em irradiadores de contêiner próprio (self-container) e irradiadores em que a fonte é exposta em uma sala, que são chamados de panorâmicos (TEIXEIRA, 2002). Atualmente, são computados mais de 160 irradiadores gama industrial em operação no mundo, seja, eles de grande porte ou compactos (CALVO, 2005).

Em relação a irradiação de plantas para avaliação de danos devidos à exposição gama, o radioisótopo ^{60}Co é amplamente utilizado (TEIXEIRA, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTRUTURAÇÃO DA METODOLOGIA

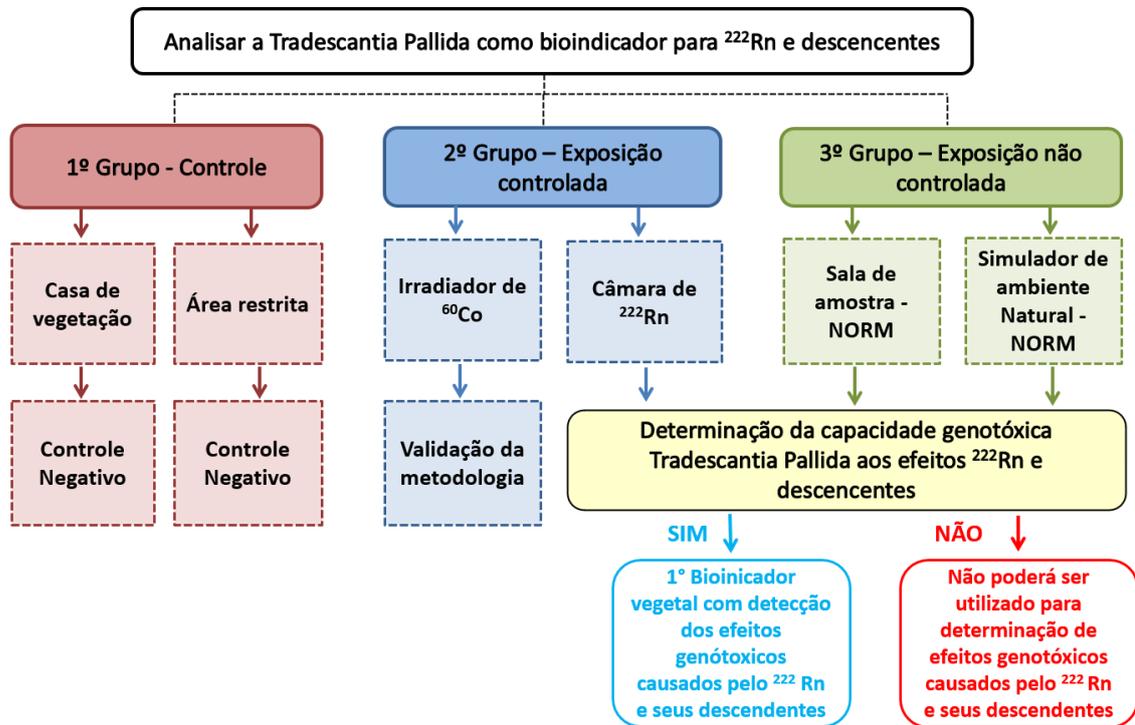
O estudo para avaliação da *Tradescantia Pallida* como bioindicador de ^{222}Rn e seus descendentes foi subdividida em três grupos: o primeiro grupo, chamado controle, foi utilizado para determinação de frequência média de micronúcleos presentes na floreira, matriz pela ação de agentes agressores externos como o ar, água e solo, representando o *background* do experimento.

A segunda etapa do experimento, segundo grupo, correspondeu a exposição controlada à radiação. Inicialmente foi utilizando um irradiador ^{60}Co , com atividade conhecida, para análise da expressão quantitativa de micronúcleos, a fim de validação da metodologia. Em seguida, novas mudas foram expostas exclusivamente ao ^{222}Rn e seus descendentes em uma câmara de radônio, para análise da expressão quantitativa de micronúcleos em função da exposição ao radionuclídeo.

A terceira etapa do experimento correspondeu ao grupo de exposição não controlada, onde mudas foram expostas em um local que simula a exposição à radioatividade ambiental derivada de Material Radioativo de Ocorrência Natural (NORM) para análise da expressão quantitativa de micronúcleos sob exposição de campo. Um fluxograma estrutural da pesquisa pode ser visto na Figura 12.

Cada grupo foi analisado por meio de bioensaios de micronúcleos de células-mãe de grão de pólen que foi determinado a capacidade genotóxica da *Tradescantia Pallida*. No qual foi analisado a eficácia da monitoração ambiental, que está definindo a *Tradescantia Pallida* como o primeiro bioindicador vegetal capaz de expressar lesões citogenéticas ocasionadas por elementos radioativos a nível ambiental.

Figura 12 - Fluxograma da Metodologia



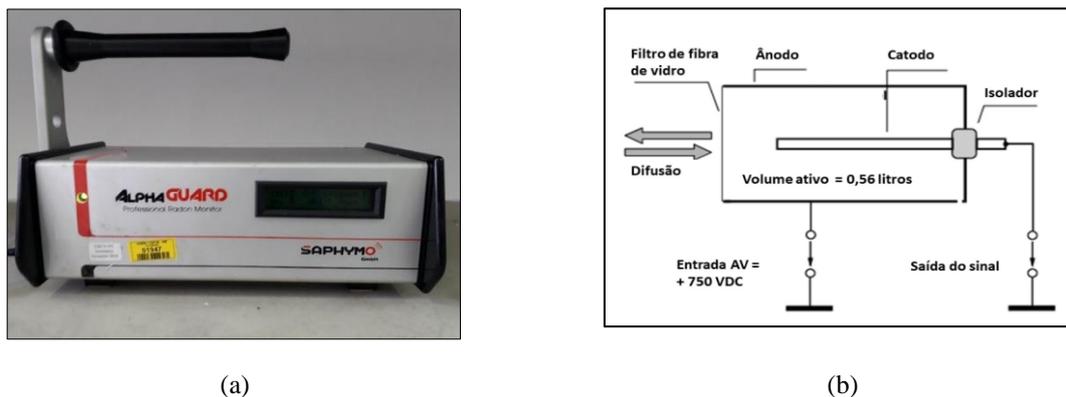
Fonte: A autora (2022).

4.2 MEDIDAS DE ^{222}Rn

4.2.1 Medidas ativas

O AlphaGUARD é um equipamento de referência na medição ativa e contínua da atividade do radônio, com elevada eficiência de detecção. As medidas ativas foram realizadas por um detector AlphaGUARD- Modelo PQ2000 PRO, do Centro Regional de Ciências Nucleares – CRCN/NE. O equipamento possui uma câmara de ionização cilíndrica com um volume ativo de 0,56 L, operando com uma diferença de potencial de +750V na superfície cilíndrica externa (metálica). O sistema de contagem relaciona o número de sinais elétricos com a concentração de atividade de radônio no ambiente, com faixa de medição desde menor que 2 Bq.m^{-3} até 2 MBq.m^{-3} . O equipamento utilizado pode ser visto na Figura 13.

Figura 13 - Esquema do detector do AlphaGUARD



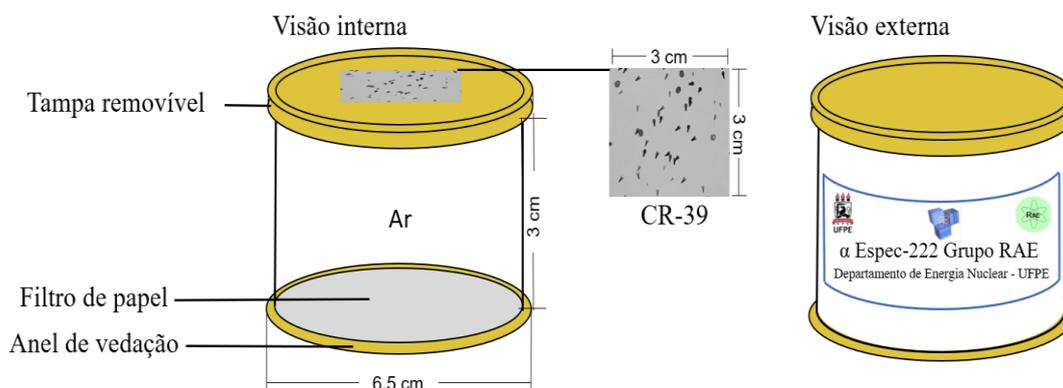
Fonte: Adaptado de Farias (2016).

Ao detector Alphaguard está acoplada uma bomba de gás, modelo AlphaPump, com três diferentes injeções de fluxo: 0,2 L/min, 0,5 L/min e 1,0 L/min. Durante as análises foi programado para realizar ciclos de aquisições de 10min durante todo o processo de monitoração com injeção de fluxo de 1,0 L/min, simultaneamente aos valores de concentração de radônio, foram determinados também: temperatura, umidade relativa e pressão atmosférica pelo próprio equipamento.

4.2.2 Medidas passivas

A determinação da concentração do ^{222}Rn para monitoração a longo prazo foi realizada por meio detectores de traços nucleares de estado sólido, *SSNTD* (solid state nuclear trace detectors) do tipo CR-39, que vêm sendo utilizados na avaliação de estudos do Rn em muitas pesquisas (ALSHAHRI, 2019). O espectrômetro alfa utilizado foi o α Espec-222, desenvolvido no trabalho de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Grupo de Radioecologia (SANTOS, 2021).

As dimensões da câmara foram construídas de forma a possibilitar o alcance máximo da partícula α no ar, de aproximadamente 4,2 cm, ou seja, tornando a câmara mais eficiente para as interações das partículas, com o alvo, neste caso, o CR-39. Na Figura 14 pode ser observado em esquema dos componentes do α Espec-222.

Figura 14 - Esquema dos componentes do α Espec-222

Fonte: Santos (2020).

A entrada da câmara possui anel de vedação com filtro qualitativo de fibras celulósicas com peso de 80 g/m^2 e espessura de $0,2 \text{ mm}$. Esse filtro serve para evitar a passagem de poeira e partículas que possam vir a interagir com o CR-39.

O CR-39 foi padronizado em quadrados, com lado medindo $3,0 \text{ cm}$. Esses polímeros foram instalados nas câmaras de difusão de ar, conforme especificadas na Figura 14, com formato cilíndrico e faces superior e inferior removíveis para facilitar a montagem do dispositivo.

Após o período de exposição, os CR-39 foram submetidos a um ataque químico com NaOH a $6,25 \text{ M}$ sob uma variação de temperatura 70°C a 90°C por um período de 6 horas. Na sequência, os polímeros foram lavados em água deionizada seguido por uma solução de CH_3COOH à $5\% \text{ v/v}$ e água deionizada novamente, para interrupção do processo de revelação.

A leitura do CR-39 foi feita em microscópio óptico, marca Leica Microsystems, modelo DM500, com iluminação tipo LED, com capacidade para quatro objetivas planacromáticas com correção infinita. Para as análises foi utilizada uma objetiva de $100\times$, o microscópio utilizado pode ser visto na Figura 15.

Figura 15 - Microscópio óptico



Fonte: Leica, 2018.

Após a varredura da superfície, foram feitas aquisições de imagens com área capturada de 0,011 cm², através do sistema de captura de imagem do próprio microscópio de modelo ICC50 E. Foram capturados 20 campos distintos durante a varredura de superfície do CR-39 para determinação da concentração do ²²²Rn.

As imagens adquiridas foram processadas pela ferramenta O DIP (Digital Image Processing), um software desenvolvido pelo Grupo de Dosimetria Numérica (GDN) do Instituto Federal de Pernambuco (IFPE), que permitiu a união dos 20 campos em uma única imagem para leitura simultânea, para posterior contagem dos traços nucleares pelo software ImageJ, ambos softwares são gratuitos. As taxas de doses serão estimadas obedecendo aos modelos de calibração com fonte de rádio certificada no CRCN/NE.

A concentração de radônio (C) em Bq.m⁻³ foi calculada fazendo uso da Equação 1, que relaciona a razão entre o número de traços (N_t) obtidos na superfície do detector exposto, com a área (A), em cm⁻², do CR-39 exposto em traços.cm⁻², o fator de calibração (k) em traços.cm⁻² por Bq.m⁻³.dia⁻¹ e o tempo em que ficará exposto (t) em dias.

$$C = \frac{N_t}{A \cdot k \cdot t} \quad (1)$$

Ao final das análises foi calculada a média aritmética correspondente ao valor de concentrações de radônio no ambiente simulado.

4.3 GRUPO 01: GRUPO CONTROLE

O grupo controle representa a floreira matriz, conforme Figura 16, fornecida por um jardineiro localizado no município de Paulista no Estado de Pernambuco. A partir da floreira matriz, foram criadas seis outras floreiras, sendo duas para cada grupo.

Figura 16 - Floreira matriz



Fonte: A autora (2022).

Foram testados dois locais para o cultivo das plantas: a casa de vegetação e uma área de acesso restrito, ambas no Departamento de Energia Nuclear. Esta etapa objetivou determinar a região ideal de melhor adaptação e reprodução da espécie, antes da realização dos ensaios.

A área foi escolhida observando as características de desenvolvimento da planta e expressão de micronúcleos através da coleta das inflorescências jovens para análise por Trad-MCN, na fase de mãe de grãos de pólen no qual foi necessária para padronização da exposição ao *background* dos ambientes, tornando os resultados fidedignos e confiáveis.

4.4 GRUPO 02: EXPOSIÇÃO CONTROLADA

4.4.1 Exposição controlada à fonte antrópica - Irradiador ^{60}Co (DEN/UFPE)

A metodologia foi atestada a partir da irradiação controlada das inflorescências por doses conhecidas de ^{60}Co , como forma de validação, por possuir energia suficiente para expressão significativa de micronúcleos (CARVALHO *et al.*, 2002).

Para a irradiação utilizou-se um irradiador Gamma Cell localizado no Departamento de Energia Nuclear da UFPE. O equipamento possui formato cilíndrico, com aproximadamente 150 mm de diâmetro por 200 mm de altura (3,7 L); modelo 220 Excel-MDS Nordion, com uma fonte ^{60}Co

e taxa de uniformidade de dose típica de 1,317 kGy/h na data de irradiação das inflorescências. Na Figura 17 está apresentada uma foto do irradiador.

Figura 17 - Irradiador ^{60}Co DEN/UFPE



Fonte: A autora (2022).

A disposição da *Tradescantia* no interior do irradiador ocorreu a partir da disposição das inflorescências entre duas placas de acrílico com altura de 4,0cm e largura 5,0cm, fixas com o auxílio de fita adesiva, para garantir a posicionamento adequado da planta durante a exposição, além disso, foi utilizado um suporte que garantir a centralização das inflorescências com o colimador da fonte de ^{60}Co , conforme observado na Figura 18.

Figura 18 - Irradiador ^{60}Co DEN/UFPE



Fonte: A autora (2022).

Após a fixação, foram separados três grupos com três inflorescências cada. O primeiro grupo foi utilizado como controle, ou seja, não houve exposição de ^{60}Co , para que ocorresse a determinação do *background*. Para os demais grupos, a exposição ocorreu de forma única, ou seja, as três inflorescências foram fixadas e expostas ao mesmo tempo, garantindo a uniformidade da dose recebida pela planta. Os dados de exposição utilizados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados de exposição da *Tradescantia Pallida* no irradiador de ^{60}Co

Dose (Gy)	<i>Tradescantia Pallida</i>	
	Tempo de exposição	Taxa de dose equivalente
	(s)	(kGy/h)
0	-	-
5	9,151	1,1317
10	22,817	1,1317

Fonte: A autora (2022).

Como visto na Tabela 2, o segundo grupo foi submetido a irradiação por ^{60}Co com uma dose de 5 Gy com tempo de exposição de 9,151 segundos e a taxa de dose foi equivalente a 1Gy,/h; o terceiro foi irradiado com uma dose de 10Gy com o tempo de exposição de 22,817 segundos e taxa de dose equivalente semelhante ao segundo grupo, garantido a uniformidade da dose em ambos os grupos.

4.4.2 Exposição controlada à fonte natural - Câmara de radônio (CRCN/NE)

O grupo de exposição controlada foi submetido à radiação em uma câmara de radônio, localizada no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE) da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). A câmara, ver Figura 19, possui dimensão externa de 100 cm de comprimento, 85 cm de largura e 100 cm de altura.

Figura 19 - Câmara de radônio



Fonte: A autora (2022).

O ^{222}Rn foi inserido na câmara pelo decaimento de uma fonte de ^{226}Ra adquirida da Pylon Electronics Inc. Canadá, modelo RN-1025, com atividade inicial de 105 kBq em 07/10/1992.

Um grupo de seis inflorescências foram dispostas no interior da câmara e separadas por período de exposição. As exposições ocorreram em tempos de 2, 4 e 6 dias. As inflorescências foram dispostas no interior da câmara conforme apresentado na Figura 20.

Figura 20 - Exposição das inflorescências na câmara de ^{222}Rn CRCN/NE

Fonte: A autora (2022).

A concentração medida de ^{222}Rn foi em torno de 2.000 Bq.m^{-3} , monitorada durante todo o experimento pelo detector Alphaguard, descrito em 4.2.1, programado para realizar ciclos de aquisições de 10min durante todo o processo de exposição.

4.5 GRUPO 03: EXPOSIÇÃO NÃO CONTROLADA

Para o grupo de exposição não controlada foram realizados testes em três locais distintos, que são detalhados na sequência.

4.5.1 Sala de amostras (DEN/UFPE)

O experimento também foi conduzido num ambiente com alto *background* radioativo natural, onde são armazenadas amostras de matrizes ambientais e de processamento industrial, como: rochas, solo, incrustações de processamento industrial contendo NORM, localizado na sala de amostras do Departamento de Energia Nuclear.

A sala de amostra possui 3,00m de altura, 4,60m de largura, 7,40m de profundidade, possui uma porta de entrada com medidas correspondentes a 2,10m de altura e 0,80m de largura; e na face posterior, uma janela com 0,99m de altura e 1,45m de largura, cuja região inferior está situada a 1,20m do piso. Durante o período do experimento, a sala foi interditada, a fim que não houvesse entrada de pessoas não autorizadas. Um desenho esquemático da sala de amostras está apresentado Figura 21.

Figura 21 - Sala de amostra DEN/UFPE



Fonte: A autora (2022).

Uma floreira foi disposta neste ambiente, a uma distância de 0,60m de uma rocha de urânio objetivando simular a exposição ambiental em áreas impactadas pelos radionuclídeos naturais. A floreira e a rocha ficaram dispostas próximas à janela, que permaneceu fechada durante todo o experimento, conforme pode ser observado na representação na Figura 22.

Após a implementação da floreira na sala de amostras, a cada 5 dias foram coletadas inflorescências para avaliação da influência da exposição ambiental do ^{222}Rn ao longo do tempo, por um período de 15 dias. A planta ficou exposta a uma concentração média de $130 \pm 47 \text{ Bq/m}^3$, temperatura de $28,6^\circ\text{C}$, pressão de 1014 mbar, umidade relativa do ar de 76,5% e uma dose média de $0,984 \mu\text{Sv/h}$.

Figura 22 - Representação da exposição da floreira na sala de amostra



Fonte: A autora (2022).

4.5.2 Simulador de ambiente natural

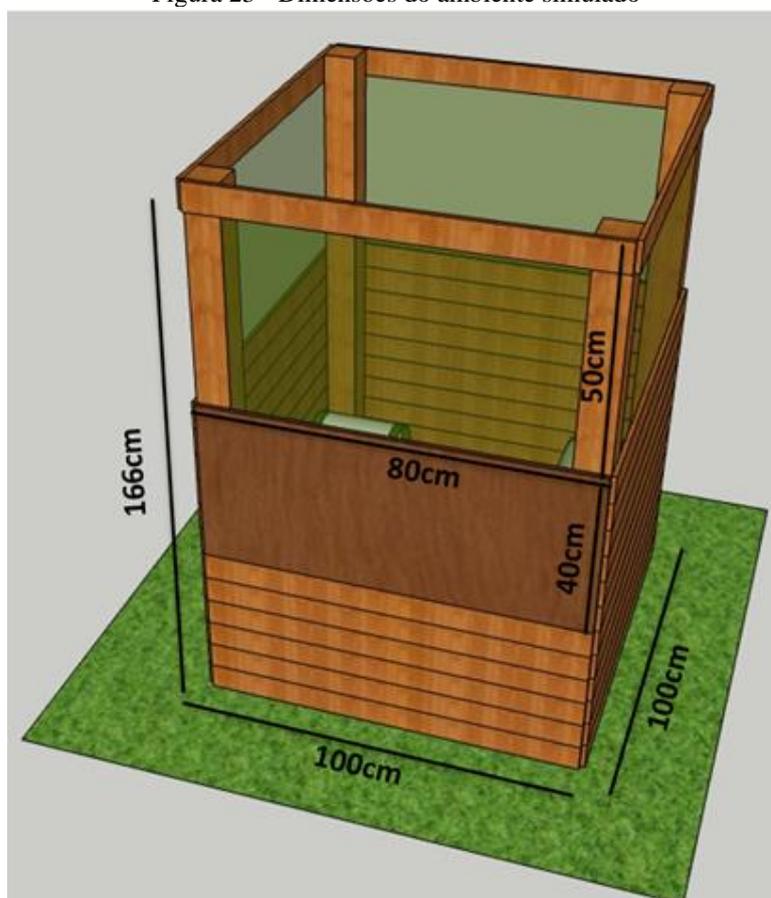
Outra fase do estudo foi à construção de um ambiente simulador, com o objetivo de caracterizar um ambiente com alto *background* radioativo natural, para tanto foram utilizadas amostras de matrizes ambientais tais como rochas e solos retirados de locais caracterizados com elevado NORM, simulando assim áreas de elevada exposição ambiental.

O simulador de ambiente natural foi construído em madeira, de forma retangular, com altura de 166 cm e base quadrada com aresta de 100 cm, com uma porta de acesso lateral de dimensões 40 cm x 80 cm, com a finalidade de facilitar o acesso ao interior do simulador para retirada das inflorescências para as análises, conforme pode ser visto na Figura 23.

Todas as faces laterais, a uma altura de 116 cm, tendo como referência o chão, foram envoltas por plástico de filme PVC, para minimizar a fuga do gás presente no interior do simulador, otimizando a concentração do ^{222}Rn no ambiente. Tanto as faces laterais superiores, acima da porta de acesso, quanto o teto foram envoltos por uma tela fachadeira, a fim de preservar o experimento, dificultando o acesso de animais ao interior do simulador.

A dimensão e o planejamento do ambiente foram projetados para garantir condições favoráveis para o desenvolvimento adequado da espécie, como a passagem de luz solar, por exemplo; acomodar duas floreiras da *Tradescantia Pallida*; acomodar os dispositivos de monitoração da concentração do ^{222}Rn , como também permitir o acesso para retirada das inflorescências.

Figura 23 - Dimensões do ambiente simulado

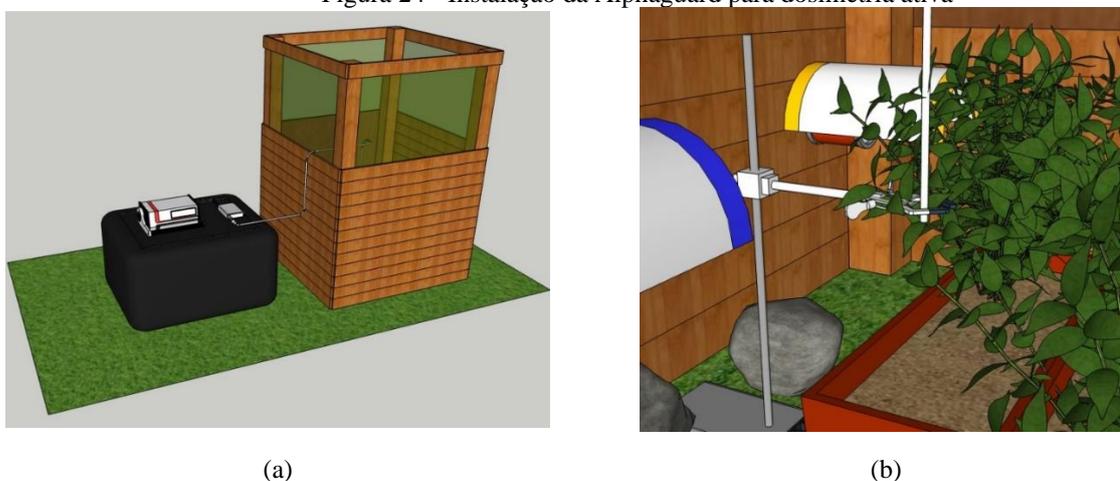


Fonte: A autora (2022).

4.5.2.1 Medidas ativas – Alphaguard

Para atestar a presença de ^{222}Rn no simulador, foi utilizado o Alphaguard, descrito em 4.2.1, nos primeiros dias após a construção. A mangueira do detector foi posicionada com o auxílio de uma haste metálica a uma altura de 7,5cm do chão entre as floreiras, onde predomina o surgimento das inflorescências. Os valores de concentração foram registrados por um período de 72 horas consecutivas. O arranjo experimental de dosimetria ativa está representado pela Figura 24.

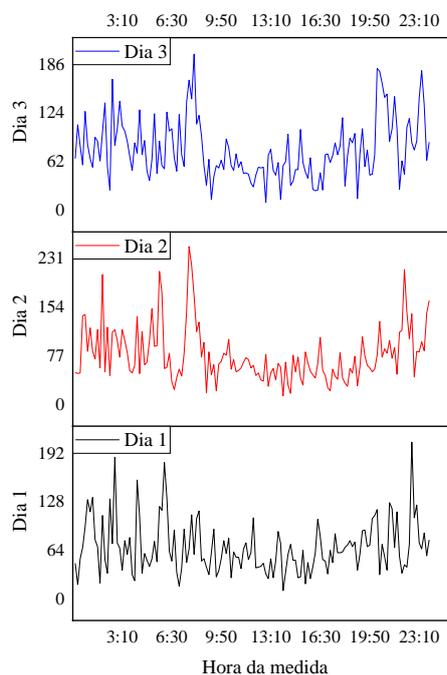
Figura 24 - Instalação da Alphaguard para dosimetria ativa



Fonte: A autora (2022).

Após 72 h de monitoração, foi possível constatar a presença de ^{222}Rn no ambiente construído durante os três dias, conforme pode ser observado na Figura 25

Figura 25 - Monitoração de ^{222}Rn no simulador de ambiente natural

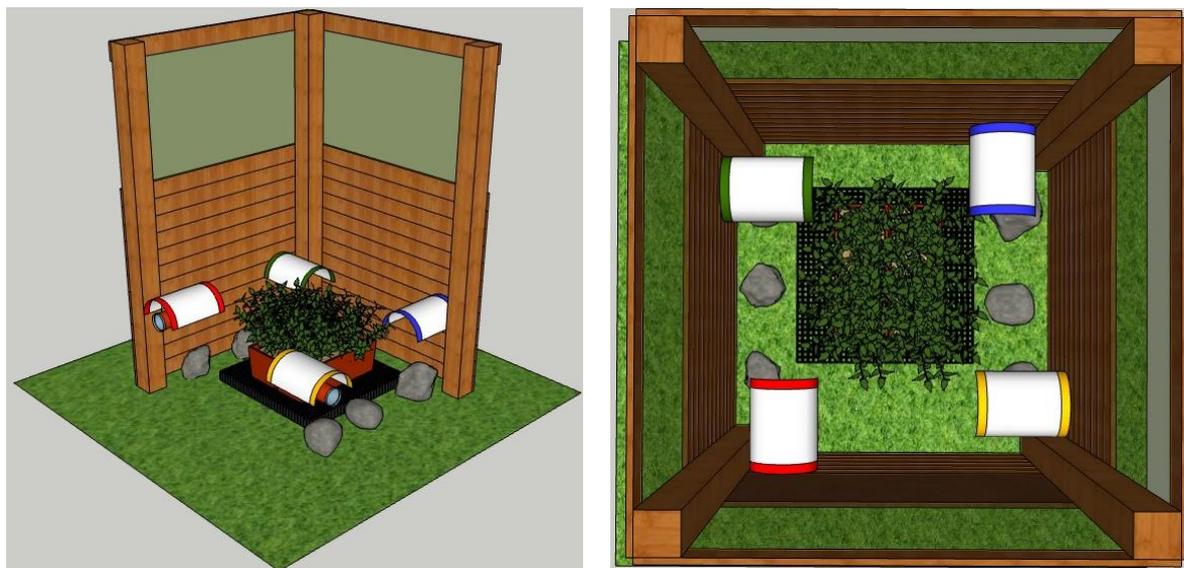


Fonte: A autora (2022).

Ao longo dos três dias foram observados valores de concentração de ^{222}Rn que variaram entre 35 Bq.m^{-3} a 123 Bq.m^{-3} . Comprovando que o simulador de ambiente natural, possui concentrações de radônio e progênie. Tais concentrações podem ser observadas na figura 25.

4.5.2.2 Medidas Passivas CR-39

A realização da dosimetria passiva, para monitoração em longo prazo, consistiu na distribuição de quatro dosímetros espectrômetros α Espec-222 próximos aos vértices das paredes, a uma altura de 7,5 cm da superfície, ver Figuras 26 (a) e 26 (b). As medidas passivas foram iniciadas simultaneamente à dosimetria ativa com o Alphaguard, como observado na Figura 24 (c).

Figura 26 - Instalação dos sistemas de dosimetria do ^{222}Rn 

(a)

Vista ortogonal da distribuição dos dosímetros passivos

(b)

Vista superior da distribuição dos dosímetros passivos



(c)

Medições simultâneas por dosimetria ativa e passiva

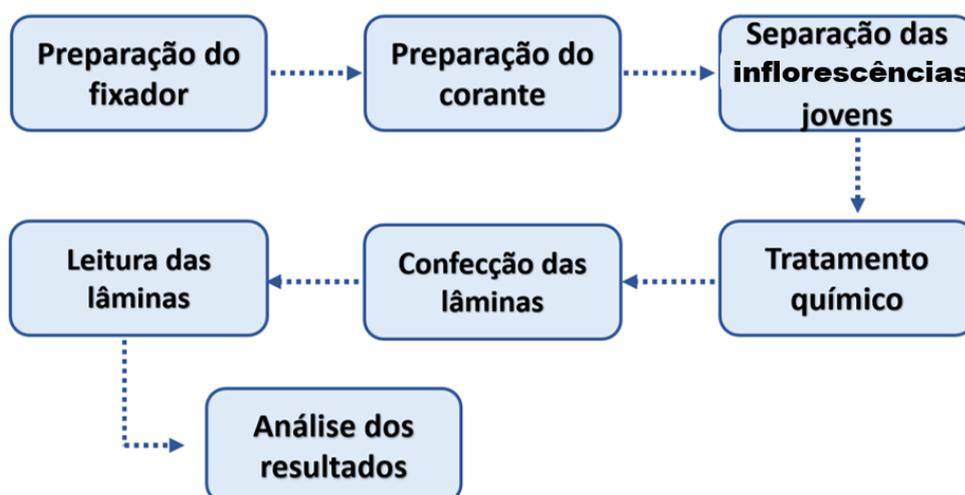
Fonte: A autora (2022).

Após o período de 90 dias, os dosímetros foram retirados do simulador, para determinação da concentração média de ^{222}Rn durante o período do experimento. As influorescências foram analisadas a cada 30 dias de exposição durante um período de 3 meses, correspondente ao período de leitura dos dosímetros.

4.6 BIOENSAIO POR TRAD-MCN

A determinação dos efeitos genotóxicos causados a *Tradescantia Pallida* foram determinados a partir de bioensaios em células-mãe de grãos de pólen (Trad-MCN). Os estudos com a *Tradescantia* requer cuidados e protocolos para análise de mutações dos micronúcleos, desta forma, baseado na literatura, as análises foram realizadas tendo como referência as etapas descritas na Figura 27.

Figura 27 - Fluxograma para ensaio por Trad - MCN



Fonte: A autora (2022).

4.6.1 Preparação do Fixador

Para o ensaio de micronúcleo em *Tradescantia* foi utilizado o protocolo descrito por Maia e colaboradores (1994), processo mais difundido até a atualidade, pois evita a autólise celular impedindo a proliferação de microorganismo e aumenta a resistência das células para a próxima etapa, o processo de coloração.

A preparação da solução fixadora foi realizada através da diluição de etanol e ácido acético glacial, sendo $\frac{3}{4}$ do volume total da solução composta de etanol e $\frac{1}{4}$ de ácido acético glacial, formando uma solução Carnoy. A diluição foi realizada imediatamente antes do uso, e o volume utilizado foi de 10 vezes maior que a massa do material a ser estudado.

4.6.2 Preparação do corante

Para a coloração das lâminas foi utilizado uma adaptação do Método de Feulgen de acordo com o protocolo descrito por Modindin e Aguiar-Perecin (2009). Este processo é baseado na utilização do corante Carmim Acético a 1%.

A preparação do corante consistiu no aquecimento até a fervura de 2 mL de ácido acético glacial a 45% em Erlenmeyer tampado com papel alumínio, em seguida foi acrescentado 0,1g de ácido Carmin sob agitação constante em placa aquecedora por um minuto. Após o resfriamento em temperatura ambiente, a solução foi filtrada e armazenada em recipiente escuro e mantido sob refrigeração.

4.6.3 Separação das Inflorescências

Existe uma parte específica e uma fase ideal para a coleta da planta, nesse caso, as inflorescências jovens, no qual o botão floral está na fase intermediária (conforme mostrado na Figura 28), protegido por brácteas. Nesta fase, as células estão em estágio de tétrade das células-mãe de grãos de pólen, ocorrendo por sua vez, à fase de divisão celular chamada de G1.

Figura 28 - Estágio da inflorescência Jovem



Fonte: A autora (2022).

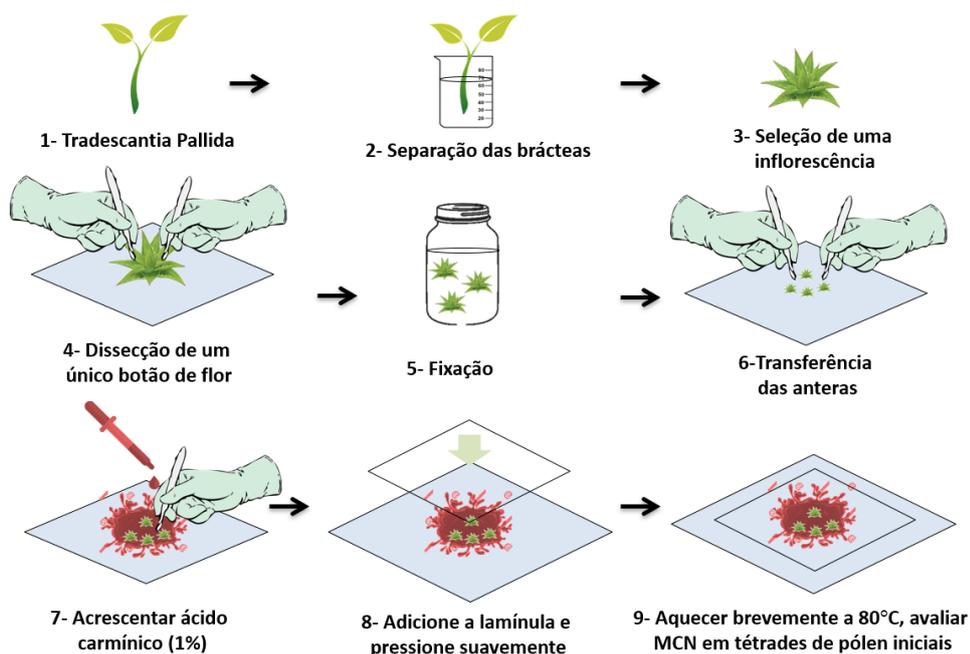
Foram selecionadas inflorescências jovens, que continham grãos de pólen na forma de tétrades, com cerca de 10 a 15 cm de comprimento, com flores ainda fechadas, conforme Figura 28, coletadas 24 horas antes do bioensaio. Em seguida iniciou-se o processo de confecção das lâminas.

4.6.4 Confecção das Lâminas

Após a seleção das inflorescências, foi realizado a coleta juntamente com as bractéas observando que as mesmas possuíam as características semelhantes de tamanho e cor, em seguida foi realizado o isolamento dos botões florais afim de aumentar as chances de visualização das células- mãe de grãos de pólen no estágio de tetrade, utilizando-se primeiramente os botões de tamanho intermediário em cada inflorescência dissecada.

Com o botão floral selecionado foi transferido para uma lâmina e separado com um estilete histológico para exposição das anteras. Após os fragmentos celulares resultantes da dissecação do botão floral foram retirados e descartados, as anteras no qual foram adicionadas na solução fixadora por um período de 24horas. Em seguida o pólen foi removido da solução fixadora com o auxílio de uma pinça e depositado nas lâminas.

Figura 29 - Fluxograma de preparação das lâminas



Fonte: A autora (2022).

Após a separação das anteras as mesmas foram fixadas às mesmas foram transferidas para uma lâmina limpa e seca no qual receberam o processo de coloração, realizado pelo corante carmin acético 2%. A lamínula foi inserida acima da lâmina pressionando suavemente as anteras para liberação das células. A fixação do corante nas células foi garantida pelo aquecimento rápido (5 segundos) da lâmina à temperatura média de 80°C, utilizando placa

aquecedora. O processo esquemático de confecção das lâminas pode ser visualizado no fluxograma da Figura 29.

Após a preparação, as lâminas foram codificadas de forma que não houvesse interferência de leitura do analisador nos diferentes grupos.

4.6.5 Leitura das Lâminas

A leitura das lâminas foi realizada através de um microscópio óptico marca Leica Microsystems, modelo DM500, descrito 4.2.2, com objetiva de 40X e 100X. As lâminas apenas foram consideradas válidas quando analisadas contabilizado um número mínimo de 300 tétrades. A frequência de tétrades por lâmina (T) está representada pela equação 1:

$$T = N^{\circ} \text{ de tétrades em um grão de pólen } \times N^{\circ} \text{ de grãos de pólen em uma lâmina} \quad (1)$$

O número de micronúcleos por lâmina (N) foi determinado de forma análoga à frequência de tétrades por lâmina, onde esse fator foi calculado com o produto de micronúcleos em um grão de pólen e a quantidade total de grão de pólen em uma lâmina. Como apresentado na equação 2.

$$N = N^{\circ} \text{ de MCN em um grão de pólen } \times N^{\circ} \text{ de grãos de pólen em uma lâmina} \quad (2)$$

A relação (f_m) entre o número de MCN e a frequência de tétrades e por lâmina é determinada pela equação 3,

$$f_m = \frac{N}{T} \quad (3)$$

Essa relação expressa à quantidade de danos a nível citogenéticos ocasionados em cada lâmina, no qual, quanto maior for esse índice (f_m) maior serão os danos na amostra.

4.6.6 Análise Estatística

A estatística é uma ferramenta muito utilizada na compilação e identificação de dados em estudos ambientais. Partindo deste princípio, os resultados finais foram tratados estatisticamente para identificação de valores máximos, mínimos, médias, distribuição dos resultados entre outros parâmetros, nas frequências de micronúcleos em vários níveis de exposição ambiental .

O teste utilizado na investigação da distribuição do conjunto de dados foi o não paramétrico de Wilcoxon, com correção de Friedman (TORMAN *et al.*, 2012).

Este teste observa a máxima diferença absoluta entre a contagem de frequência de micronúcleos por tétrades em diferentes níveis de exposição à radiação ionizante. Como hipótese nula foi considerada a distribuição normal dos níveis de radioatividade das referidas regiões (H_0), e H_1 como hipótese alternativa, aplicado quando os dados não seguem a distribuição esperada. Foram realizadas também comparações de conjuntos de dados com o teste U de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 GRUPO CONTROLE

5.1.1 Casa de vegetação

As condições de plantio ocorreram, em dezembro de 2020 foram coletas três inflorescências e preparadas através do processo descrito em 4.6.4. Os dados de leitura das lâminas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados de leitura das lâminas para casa de vegetação

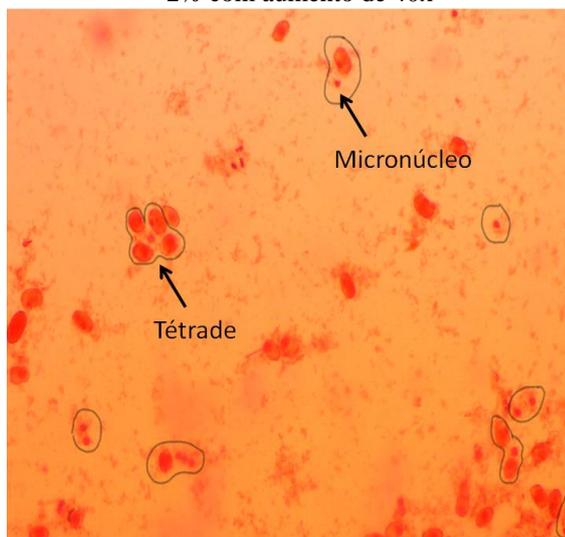
Lâminas	<i>Tradescantia Pallida</i>		
	Tétrade	Micronúcleo	Micronúcleo / Tétrade
1 ^a	600	90	0,15
2 ^a	540	81	0,15
3 ^a	400	60	0,15
Média ± desvio padrão	513 ± 102	77 ± 15	0,15

Fonte: A autora (2022).

Como visto na Tabela 3, durante a análise em microscópio na primeira lâmina, foram detectadas cerca de 600 tétrades e 90 micronúcleos, resultando em um total de 0,15 micronúcleos por tétrade. Na Figura 30, é possível observar a característica comum das lâminas obtidas para a casa de vegetação, micronúcleos isolados e associados a tétrades.

Na segunda lâmina, foram obtidas 540 tétrades e 81 micronúcleos, representado um total de 0,15 micronúcleos por tétrade. Já na terceira lâmina, foram obtidas 400 tétrades e 60 micronúcleos, representado um total de 0,15 micronúcleos por tétrade. Estas análises permitiram a determinação de um valor médio de 513 ± 102 tétrades, 77 ± 15 micronúcleos, e por fim $0,15 \pm 0$ micronúcleos por tétrade na casa de vegetação.

Figura 30 - Lâmina para avaliação dos micronúcleos na casa de vegetação, lâmina corada com carmim acético 2% com aumento de 40x



Fonte: A autora (2022).

A expressão de micronúcleos observada, pode ter tido como interferência em contaminantes a poluição atmosférica, tendo em vista vários estudos publicados relatando a sensibilidade da espécie com alguns contaminantes (CARVALHO *et al.*, 2015; LONGHI, 2020; SALDIVA PAULO, 2000; P.H.N. SALDIVA *et al.*, 2021). O plantio estava localizado a 400 metros das margens da Avenida Professor Luiz Freire, 1000, local de grande fluxo de veículos.

Yaguinuma e Fluminhan (2014) avaliaram danos genéticos por micronúcleos causados na *Tradescantia pallida* por radiação solar e poluição do ar, os resultados publicado pelos autores sob as condições de sombra e tráfego leve, sol e tráfego leve, sombra e tráfego intenso e sol e tráfego intenso foram uma média de 1,46, 1,33, 1,70 e 1,79 micronúcleos por tétrade, valores próximos ao obtido durante as análises, podendo contribuir para possível contaminação do ambiente associado ao experimento e resultados obtidos.

5.1.2 Simulador de ambiente natural

Em abril/2021 foram realizadas coletas de três inflorescências e preparadas para análise MCN. Foram produzidas um número total de 3 lâminas padronizadas de forma que cada uma obtivesse 23,4mg de grãos de pólen.

Após o desenvolvimento da *Tradescantia* de forma satisfatória, diferentemente das condições iniciais observadas na casa de vegetação, foram analisadas três lâminas; os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados de leitura das lâminas para o ambiente simulado

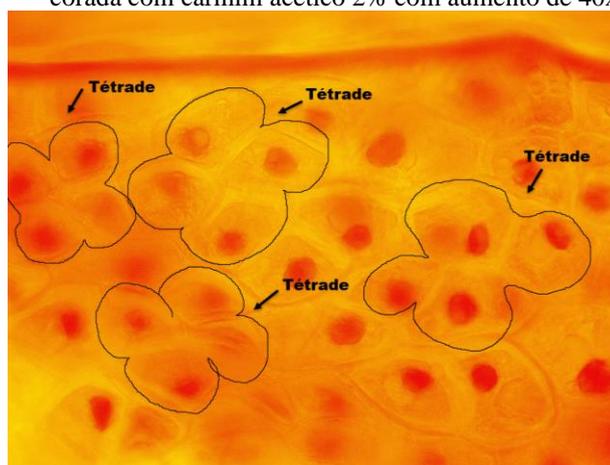
Lâminas	<i>Tradescantia Pallida</i>		
	Nº de tétrades observadas	Nº de micronúcleos observados	Nº de micronúcleo por tétrade
1 ^a	420	-	-
2 ^a	450	-	-
3 ^a	568	-	-
Média ± desvio padrão	479 ± 78	-	-

Fonte: A autora (2022).

Durante a análise em microscópio, foram detectadas na primeira lâmina cerca de 420 tétrades, na segunda 450 e na terceira 568, contudo não foram observados quantidades significativas, desta forma não caracterizando expressão de micronúcleos em nenhuma delas. A Figura 31, da primeira lâmina, demonstra apenas a presença de tétrades e ausência de micronúcleos.

Devido a ausência de micronúcleos na área restrita, e as condições favoráveis para o desenvolvimento da planta, esta área foi escolhida para o cultivo definitivo, representado assim um controle negativo apropriado para o experimento, pois qualquer expressão de micronúcleos seria originado pela radiação.

Figura 31 - Lâmina para avaliação dos micronúcleos na área simulador de ambiente natural, corada com carmim acético 2% com aumento de 40x



Fonte: A autora (2022).

5.2 GRUPO DE EXPOSIÇÃO CONTROLADA

5.2.1 Exposição controlada à fonte antrópica - Irradiador ^{60}Co

Para a validação da metodologia, as análises foram realizadas com um conjunto de três lâminas para cada grupo com massa padronizada conforme definido em 4.6.4. Os dados obtidos tanto para o grupo controle, sem irradiação, e para os demais grupos expostos com doses de 5Gy e 10Gy estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados de leitura das lâminas para o simulador de ambiente natural

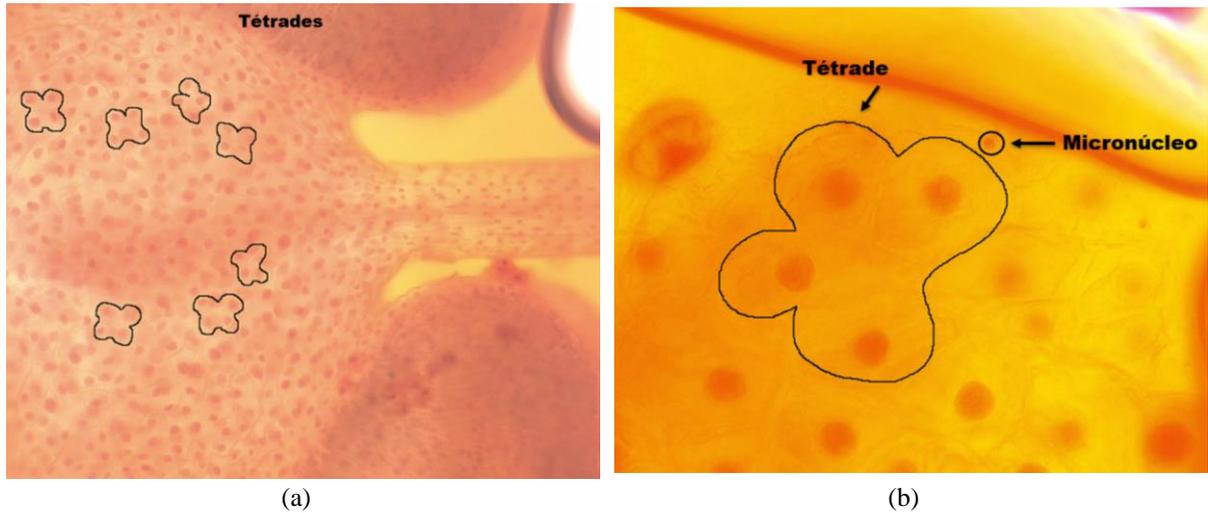
Dose	<i>Tradescantia Pallida</i>		
	Nº de tétrades observadas (média ± desvio padrão)	Nº de micronúcleos observados (média ± desvio padrão)	Nº de micronúcleos por tétrades (média ± desvio padrão)
0Gy	513 ± 93	-	-
5Gy	781 ± 88	562 ± 90	0,72 ± 0,15
10Gy	194 ± 113	625 ± 399	3,15 ± 0,59

Fonte: A autora (2022).

Como visto na Tabela 5, o primeiro conjunto de inflorescências analisados foi o grupo controle, com uma média de 513 ± 93 tétrades e nenhum micronúcleo, o que já era esperado devido aos resultados obtidos no simulador de ambiente natural durante a escolha do local de plantio.

Para o segundo grupo, irradiação de 5Gy, foi observado o aumento considerável do número de tétrades, com uma média de 781 ± 88 , a Figura 32a mostra o grande número de células presente em um grão de pólen. Em termos de micronúcleos, foi observado um valor médio de 562 ± 90 , decorrente da irradiação, a tétrade com micronúcleo pode ser vista na Figura 32b, indicada pelas setas pretas. Relacionando o número de micronúcleos observados por número de tetrades, foi determinado um valor médio para a exposição de 5Gy foi $0,72 \pm 0,15$.

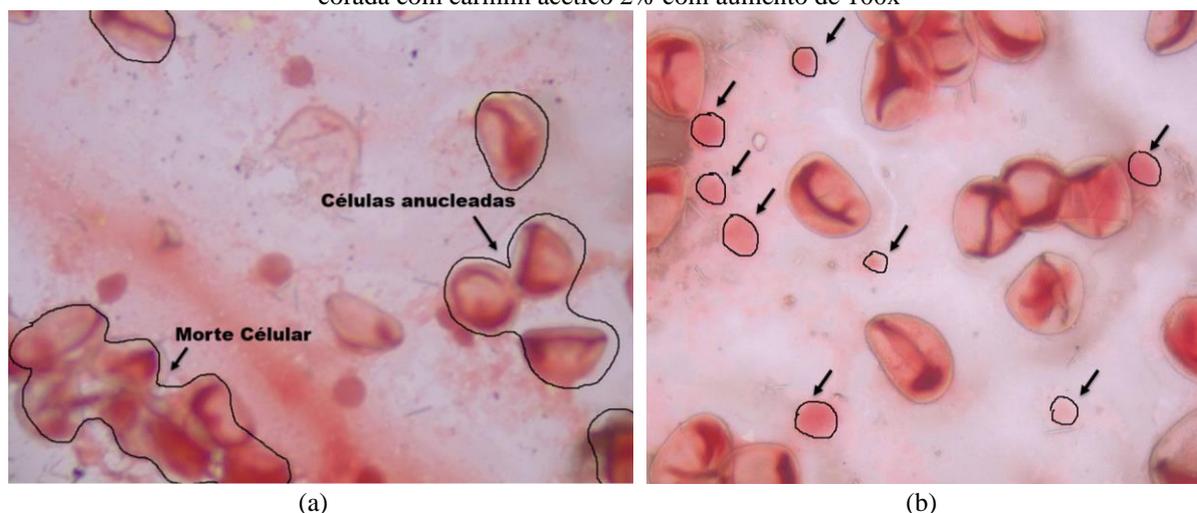
Figura 32 - Análise por microscopia óptica das influorescências irradiadas com dose de 5Gy por ^{60}Co corada com carmin acético 2% com aumento de 40x e 100x



Fonte: A autora (2022).

No terceiro grupo, irradiação de 10 Gy, foi notável a redução do número de tétrades, uma média de 194 ± 113 , sendo uma possível causa associada ao grande número células mortas observadas na análise por microscopia óptica, justificada pelo dano efetivo sobre as células, levando-as a apoptose celular, como pode ser visto na Figura 33a, caracterizada pela presença de células anucleadas. Em relação ao número de micronúcleos, foi observado um aumento significativo, com um valor médio de 625 ± 399 , resultando em uma proporção de $3,15 \pm 0,59$ micronúcleos por tétrede. Na Figura 33b observa-se o aumento considerável de micronúcleos, indicado por setas pretas.

Figura 33 - Análise por microscopia óptica das influorescências irradiadas com dose de 10Gy por ^{60}Co corada com carmim acético 2% com aumento de 100x



Fonte: A autora (2022).

A partir destes resultados, é possível observar que a metodologia aplicada para análise MNC em *tradescatia pallida* foi executada adequadamente, tendo em vista que Sparrow *et al.*, 1972 realizou exposições com intervalo de dose entre 10 e 100cGy para construção de uma curva resposta da *Tradescantia*, como resultado do estudo, foi determinado aumento do número de micronúcleos proporcionalmente à dose, efeito que foi observado entre a expressão de micronúcleos nas exposições de 5Gy e 10Gy. No qual observamos aumento de cerca de 100% de micronúcleos após o dobro da dosagem de radiação. Comprovando os resultados dos teste realizado por Sparrow *et al.*, 1972.

5.2.2 Exposição controlada à fonte natural - Câmara de radônio (CRCN/NE)

As análises foram realizadas com um conjunto de três lâminas para cada período de exposição, seguindo os critérios de padronização definidos em 6.4.6 aplicado em todas as análises. Os dados referentes ao grupo controle e as exposições ao ^{222}Rn estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados de leitura das lâminas para a câmara de ^{222}Rn

Dias de exposição na câmara de ^{222}Rn	<i>Tradescantia Pallida</i>		
	Nº de tétrades observadas (média ± desvio padrão)	Nº de micronúcleos observados (média ± desvio padrão)	Nº de micronúcleos por tétrades (média ± desvio padrão)
0 dias (grupo controle)	388 ± 33	-	-
2 dias	471 ± 68	12 ± 05	0,02 ± 0,01
4 dias	366 ± 38	36 ± 03	0,09 ± 0,01

6 dias	372 ± 04	46 ± 16	0,12 ± 0,05
--------	----------	---------	-------------

Fonte: A autora (2022).

O primeiro conjunto de inflorescências analisado foi o grupo controle, com uma média de 388 ± 33 tétrades e nenhum micronúcleo, o que já era esperado devido aos resultados obtidos para o grupo controle nas análises anteriores.

O primeiro grupo de período de exposição, dois dias, foram obtidas uma média de 471 ± 68 tétrades e 12 ± 05 micronúcleos, contabilizando um intervalo de cerca de trinta e nove tétrades para o surgimento de um micronúcleo, estes fatores indicam que a planta apresentou uma sensibilidade mínima à exposição do radônio (SPARROW *et al.* em 1972). Tendo em vista que os valores de controle negativo apresentaram negativo a presença de micronúcleos.

Para o segundo grupo, com exposição de quatro dias, foram obtidas uma média de 366 ± 38 tétrades e 36 ± 03 micronúcleos, contabilizando cerca de onze tétrades para o surgimento de um micronúcleo cerca, estes fatores indicam que o aumento dos dias de exposição caracteriza o aumento de expressão de micronúcleos.

O terceiro grupo de período de exposição, seis dias, foram obtidas uma média de 372 ± 04 tétrades e 46 ± 16 micronúcleos, contabilizando cerca de quarenta e seis tétrades para o surgimento de fragmentos dispersos de possíveis micronúcleo, estes fatores indicam que a planta não apresentou uma média de expressão por micronúcleo considerável em relação ao segundo grupo. Contudo, o aumento do número de micronúcleos isolados e seus fragmentos entre as exposições é notável, pois em determinados campos pode-se observar a ausência de tetrades com excesso de micronúcleos. As condições de exposição ao longo dos dias estão apresentadas na Tabela 7.

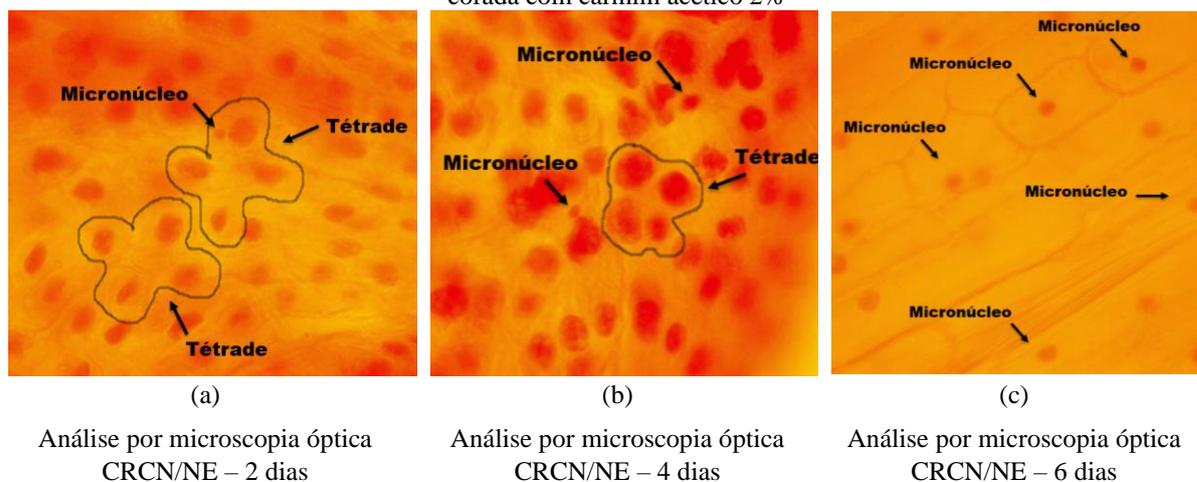
Tabela 7 - Características de exposição das inflorescências na câmara de ^{222}Rn

Período de exposição (dias)	Concentração média (Bq/m ³)	Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)
2	1790 ± 219	22	68
4	2000 ± 221	22	52
6	2100 ± 241	20	65

Fonte: A autora (2022).

Na Figura 34 podem ser observadas fotos das lâminas de leituras referentes ao grupo de exposição na câmara de radônio, com dois dias (34a); quatro dias (34b) e seis dias (34c).

Figura 34 - Análise por microscopia óptica por exposição ao ^{222}Rn com objetiva de 40x e 100x corada com carmim acético 2%



Fonte: A autora (2022).

Os resultados obtidos durante o período de exposição indicam que a *Tradescantia pallida* apresentou efeitos genotóxicos associados à exposição ao ^{222}Rn e seus descendentes.

5.3 GRUPO DE EXPOSIÇÃO NÃO CONTROLADA

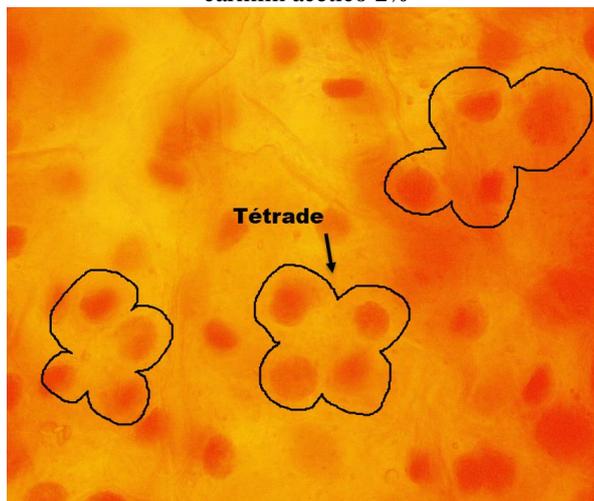
5.3.1 Sala de amostras (DEN/UFPE)

Durante 05 dias a planta sofreu exposição a radiação ambiental, foi observado parâmetros macroscópicos como por exemplo: cor, espessura da raiz, coloração de caule, surgimento de flores, disposição das folhas. Notou-se que a floreira estava mudando de cor de roxo para verde, essa característica foi decorrente da ausência de sol que dificultou a realização da fotossíntese levando a mudança de coloração (BOSCOLLI BARBOSA, 2013).

Apesar das condições visualizadas na floreira, foram coletadas inflorescências e preparadas duas lâminas para a leitura.

Na primeira lâmina observou-se uma média de 862 ± 132 tétrades e ausência de micronúcleos. Estes dados indicam que a concentração média de $130 \pm 47 \text{ Bq/m}^3$ associado ao ^{222}Rn não foi suficiente para provocar o surgimento de micronúcleos para uma exposição de 5 dias, conforme observado na Figura 35.

Figura 35 - Lâmina para avaliação dos micronúcleos na sala de amostras com objetiva de 100X corada com carmim acético 2%



Fonte: A autora (2022).

Para as análises com 10 dias foi observado descoloração mais intensa da planta, galhos secos, quebradiços e redução no aparecimento de inflorescências, conforme Figura 36. Foram produzidas duas lâminas, ambas sem presença de células vivas, apenas resto celular, inviabilizando a continuação do experimento na sala de amostras.

Figura 36 - Floreira da sala de amostras após 10 dias de exposição



Fonte: A autora (2022).

5.3.2 Simulador de ambiente natural

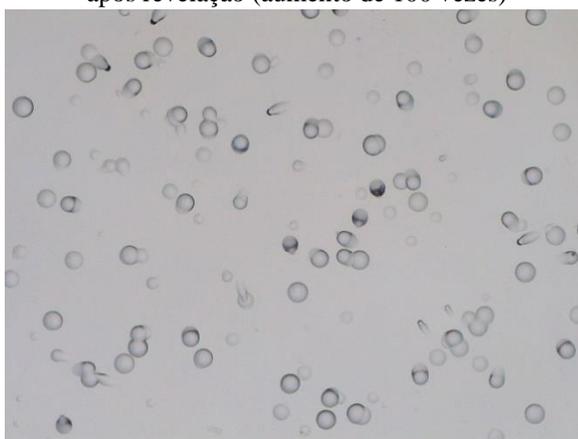
5.3.2.1 Medidas Passivas com CR-39

A análise dos dispositivos CR-39 ao final do período de 90 dias, indicaram uma concentração média de $24,48 \pm 11$ Bq/m³ podendo ser constatado a presença de ²²²Rn ao longo

do período de exposição da *Tradescantia*. Na Figura 37 está demonstrada uma imagem de microscopia óptica com a distribuição dos traços nucleares.

Algumas dificuldades foram enfrentadas com a monitoração com CR-39 devido interações externas, principalmente fenômenos climáticos, resultando na queda dos dispositivos, ocasionando irregularidade no processo de formação dos traços nucleares.

Figura 37 - Traços nucleares de um detector CR-39 exposto no período de 90 dias a um ambiente com ^{222}Rn após revelação (aumento de 100 vezes)



Fonte: A autora (2022).

5.3.2.2 Exposição da *Tradescantia pallida*

Os dados obtidos para exposição da *Tradescantia Pallida* no simulador de ambiente natural estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados de leitura das lâminas para a câmara de ^{222}Rn . Grupo de exposição controlada

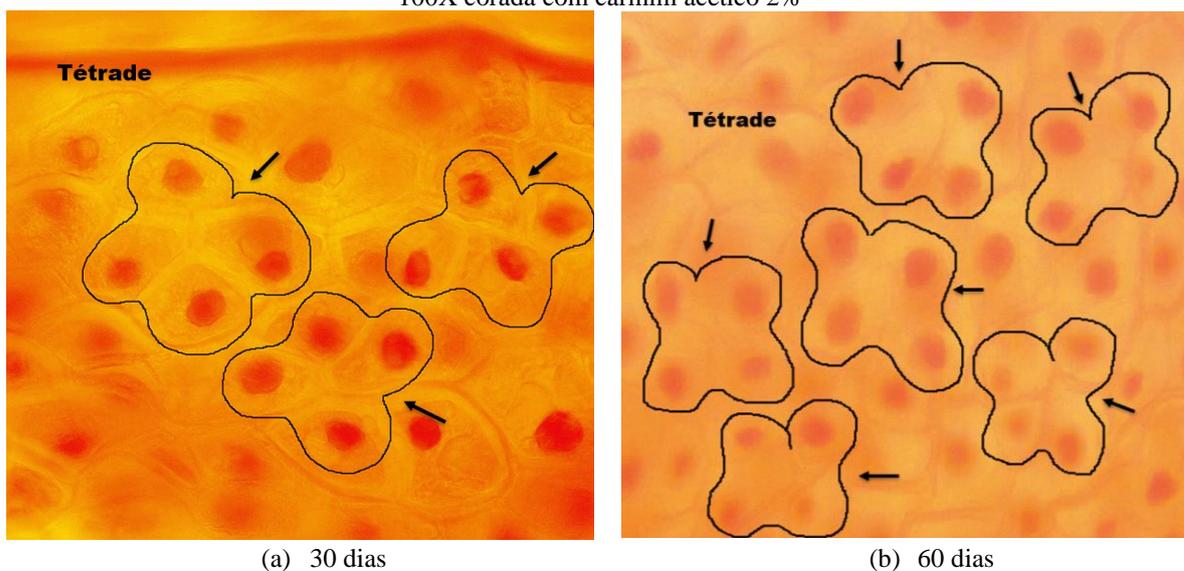
Dias de exposição na câmara de ^{222}Rn	<i>Tradescantia Pallida</i>		
	Nº de tetrades observadas (média \pm desvio padrão)	Nº de micronúcleos observados (média \pm desvio padrão)	Nº de micronúcleos por tetrades (média \pm desvio padrão)
0 dias (grupo controle)	543 \pm 57	-	-
30 dias	489 \pm 45	-	-
60 dias	547 \pm 118	-	-
90 dias	566 \pm 103	61 \pm 17	0,097 \pm 0,025

Fonte: A autora (2022).

Para o grupo controle, semelhantemente as outras análises, foram observadas tetrades, 543 \pm 57, com ausência de micronúcleos. Nos primeiros 30 dias de exposição, foram analisadas três lâminas, obtendo como valor médio de 489 \pm 45 tetrades e ausência de micronúcleos,

indicando que a planta não apresentou sensibilidade mínima à exposição a radiação presente no ambiente simulado. Após 60 dias de exposição, houve um aumento no número de tétrades, 547 ± 118 , contudo não foi observado presença de micronúcleos. Na Figura 38 podem ser observadas fotos das lâminas por análise de microscopia óptica para as exposições de 30 e 60 dias.

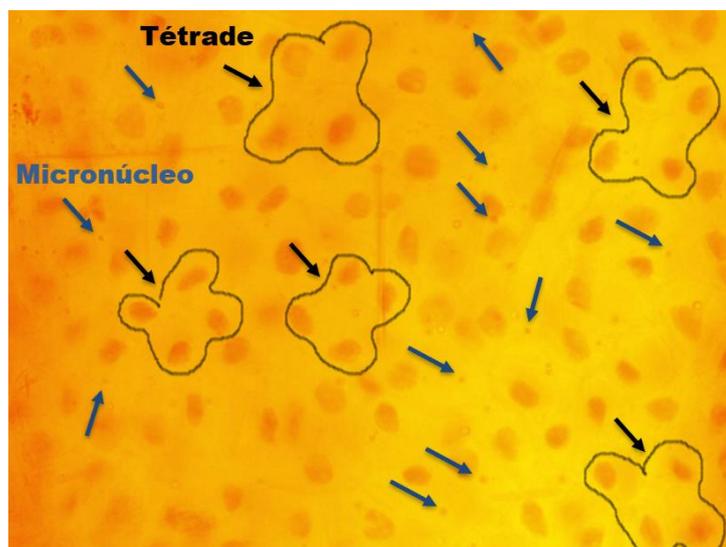
Figura 38 - Análise por microscopia óptica após exposição ao simulador de ambiente natural, com objetiva de 100X corada com carmim acético 2%



Fonte: A autora (2022).

Após 90 dias de exposição, foram obtidas uma média de 566 ± 103 tétrades e 61 ± 17 micronúcleos, contabilizando cerca de nove tétrades para o surgimento de um micronúcleo associado, estes fatores indicam que a planta apresentou uma média de expressão por micronúcleo considerável em relação aos 60 dias anteriores de exposição. Na Figura 39 estão destacados por seta azul os micronúcleos encontrados após 90 dias de exposição.

Figura 39 - Lâmina 90 dias após exposição ao simulador de ambiente natural, com objetiva de 100X corada com carmim acético 2%



Fonte: A autora (2022).

Os resultados obtidos após a exposição de 90 dias no simulador de ambiente natural, foi próxima a proporção média de micronúcleos por tétrade obtida na exposição de 4 dias na câmara de radônio.

A elevada formação de micronúcleos indica a presença de radiação ionizante no local. O que causa danos ao material genético das plantas ocasionará danos aos humanos em longo prazo, levando em considerações concentração de radiação ionizante a nível de doses ambientais (LIMA, 2001).

A vantagem da aplicação da espécie em estudo se mostrou de grande potencial e efetividade devido ao fato de ser de sistema rápido, baixo custo, baixa complexidade de interpretação e execução dos bioensaios, se revelando uma ferramenta de biomonitoramento a ser adotada como conhecimento científico.

De modo geral, os dados obtidos durante as análises estão apresentados na Tabela 09, especificando o número médio de micronúcleos por tétrade encontrada durante as análises, bem como o desvio padrão, tanto na obtenção do controle negativo, quanto as exposições da câmara de radônio e no ambiente simulado.

Tabela 9 - Comparação do número de micronúcleos por tétrade em cada grupo de exposição

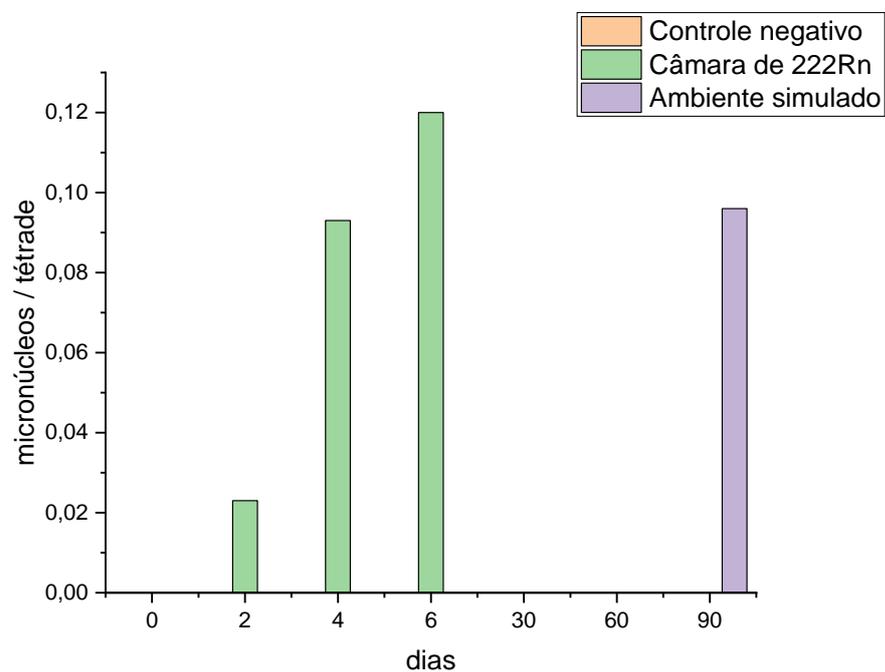
DIAS DE EXPOSIÇÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
	CONTROLE NEGATIVO	
0 DIAS	-	
	CÂMARA DE ²²²RN	
02 DIAS	0,023	0,015

04 DIAS	0,093	0,005
06 DIAS	0,120	0,045
AMBIENTE SIMULADO		
30 DIAS	-	
60 DIAS	-	
90 DIAS	0,096	0,025

Fonte: A autora (2022).

Os dados apresentados na Tabela 09 estão apresentados na Figura 40 para melhor visualização dos resultados. É possível observar que para os dias 2, 4 e 6 de exposição na câmara de radônio, indicados pela cor verde, e para os 90 dias de exposição no ambiente simulado, indicado pela cor roxa, estão bem definidos no gráfico, pois apresentaram expressão de micronúcleo por tetrade. Já o controle negativo e a expressão de 30 e 60 dias no ambiente simulado não apresentaram expressão de micronúcleo por tetrade, logo não estão evidenciados na figura 38.

Figura 40 - Esquema gráfico da comparação dos números de micronúcleos por tetrade em cada grupo de exposição



Fonte: A autora (2022).

5.3.3 Análise estatísticas dos resultados

Foram realizados testes comparativos entre os diferentes níveis de exposições e concentrações a radiação ionizante na qual a *Tradescantia pallida* foi submetida. O primeiro teste a ser utilizado foi o teste estatístico de Friedman.

Nestes testes foram comparados as exposições do ^{60}Co , câmara de ^{222}Rn e o simulador de ambiente natural, onde a análise dos fatores apresentou p valor menor que 0,05 rejeitando a hipótese nula, ou seja não são semelhantes as variáveis. Assim como apresentada na tabela 10.

Tabela 10 - Teste de Friedman para análise de variâncias

Hipótese Nula	Significância (p valor)	Decisão
As distribuições de ^{60}Co , câmara de ^{222}Rn e simulador de ambiente natural	0,044	Rejeitar a hipótese nula

Fonte: A autora (2022)

Por este método estatístico não ter como determinar qual dos três ambientes apresentaram semelhanças, podemos levar em consideração que o irradiador ^{60}Co , foi apenas utilizado para validação da metodologia utilizamos o teste de Wilcoxon no qual é possível analisar amostras em pares, desta forma foram realizados as seguintes comparações: Câmara ^{222}Rn , com Simulador de ambiente natural câmara no qual foram obtidos os seguintes resultados.

O resultado da comparação foi realizada para o ^{222}Rn entre a câmara de ^{222}Rn e o simulador de ambiente natural, de forma controlada e não controlada, respectivamente. O resultado p foi de 0,037, indicando uma diferença significativa entre as expressões de micronúcleo por tetráde, possivelmente este resultado está relacionado ao tempo de exposição no simulador de ambiente natural, sendo necessária uma exposição superior a 90 dias.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo constatou que a *Tradescantia pallida*, nos testes realizados tanto na câmara ^{222}Rn quanto no ambiente simulado apresentaram expressões de micronúcleo por tetrade, indicando assim uma sensibilidade à estes elementos radioativos. Em relação ao controle negativo das análises, a área restrita, por não apresentar expressão de micronúcleos por tétrades, foi utilizada como o local adequado para o desenvolvimento da planta, associado todas as expressões de micronúcleo por tétrades as diferentes exposições à radiação.

A metodologia aplicada ao trabalho foi validada através de exposições controladas ao ^{60}Co , comprovando lesões a níveis citogenéticos ocasionadas pela radiação ionizante. As frequências de micronúcleos observadas nas células grãos de pólen, provenientes da exposição ao ^{222}Rn e seus descendentes, foi observada a partir do segundo dia de exposição, demonstrando assim, sensibilidade mínima associada a este radioisótopo.

Em relação às exposições com níveis de ^{222}Rn semelhante a áreas de convívio humano, o simulador de ambiente natural apresentou expressões de micronúcleos por tetrade após 90 dias de exposição, demonstrando a ocorrência de dano citogenético na *Tradescantia pallida* ao ser exposta a radiação ionizante correspondente a áreas de elevado *background* radioativo.

As frequências de micronúcleos observadas nas células grãos de pólen, provenientes dos locais de exposição, apresentaram diferenças significativas, chegando resultados maiores ($p>0.05$), demonstrando dano citogenético na *Tradescantia pallida* ao ser exposta a radiação ionizante, comprovando por sua vez que a mesma pode ser considerada um bioindicador natural.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Expor a *Tradescanti pallida* a câmara de ^{222}Rn por um número maior de dias para determinar uma curva de linearidade de dose.
- Exposição da *Tradescantia pallida* no simulador de ambiente natural , por maior período para formulação de curva de linearidade com o objetivo de projeção dos resultados para áreas de convívio humano com elevado background radioativo.
- Monitoração ativa por um período de 30 dias consecutivos, a fim de determinação da variação de concentração do ^{222}Rn e seus descendentes no simulador de ambiente natural.
- Cultivar a *Tradescantia pallida* em locais de alta radioatividade ambiental para avaliar a viabilidade da espécie como bioindicador de radiação natural.

REFERÊNCIAS

- ANDRÉ, Paulo Afonso de. Câmara de Topo Aberto, CTA: **Construção de uso para observação de potencial tóxico da poluição atmosférica urbana com bioensaios em plantas**. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências, 2007.
- ALVES, E. S., DE SOUZA, S. R., PEDROSO, A. N. V.; DOMINGOS, M. **Potential of the Trad-MCN assay applied with inflorescences of *Tradescantia pallida* „Purpurea“ for evaluating air contamination by naphthalene**. *Ecotoxicol Environ.* 71 (2008) 717–721.
- BUSS, D.F.; BAPTISTA, D.F.; NESSIMIAN, J.L. **Conceptual basis for the application of biomonitoring on stream water quality programs**. *Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, 2003.
- CARVALHO, H. A.; **A tradescantia como Bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes**. *Radiologia Brasileira*, v. 38, p.459-462, 2005.
- CARVALHO, J. M. F. de.; GOMES, J. M. A. **A pobreza nos carnaubais piauienses**. **VI Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica** vol. 24 p. 2005
- COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. **Licenciamento de Instalações Radiativas**, 1998. (CNEN-NE-6.02, Rio de Janeiro, julho, 1998).
- COTELLE, S.; MASFARAUD, J. F.; FERARD, J. F. **Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium/Vicia-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays**, *Mutat. Res.* 426 (1999) 167–171.
- COUTINHO; MALHEIROS; PADILHA, **Processo participativo de criação de indicadores de desenvolvimento sustentável para o município de Ribeirão Pires, Brasil**. 2-4 p.2009.
- EMMERLING-THOMPSON, M.; NAWROCKY, M. M. **Evidence of gametic mutation for flower color in *Tradescantia***. *Environmental and Experimental Botany*, v. 22, p. 403-408, 1982
- FROEHLICH, Klaus (Ed.). **Environmental radionuclides: Tracers and timers of terrestrial processes**. Elsevier, 2009.
- GRANT, W. F.; SALAMONE, M. F. **Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens**. *Mutation Research*, V. 310, n. 2, p. 187-209, 1994
- GICHNER, T., VELEMÍNSKÝ, J. **Monitoring the genotoxicity of soil extracts from two heavily polluted sites in Prague using the *Tradescantia* stamen hair and micronucleus (MNC) assays**, *Mutation Research* 426 (1999) 163-166.
- GRANT, W.F. **The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens**, *Mutation Research*. 310 (1994) 175-185.

HACON, S.S. Ecotoxicologia. In: **As bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. Coordenadores F.A. de Azevedo, A.A. M.Chasin. Rima Editora e InterTox. São Carlos, SP, Brasil, 2003.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. **The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps**, Mutation Research. 659 (2008) 93-108.

HOUK, V.S. **The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review**. Mutation Research v. 277, p. 91-138, 1992

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Guidelines for Industrial Radiation Sterilization of Disposable Medical Products (Cobalt-60 Gamma Irradiation)**. 1990. (IAEA Technical Reports Series n.539, Vienna, 1990).

ICHIKAWA, S.; YAMAGUCHI, A, OKUMURA, M, **Synergistic effects of methyl methanesulfonate and X-rays in inducing somatic mutations in the stamen hairs of *Tradescantia* clones, KU 27 and BNL 4430**. Japanese Journal of Genetics, V. 68, n. 4, p. 277-292, 1993

ICHIKAWA, S.; NAKANO, A, KENMOCHI, M.; YAMAMOTO, I.; MURAI, M.; TAKAHASHI, E.; YAMAGUCHI, A.; WATANABE, K.; TOMIYAMA, M.; SUGIYAMA, K.; YOGO, A.; YAZAKI, T.; OKUMURA, M.; SHIMA, N.; SATOH, M.; YOSHIMOTO, M.; XIAO, L. Z. **Yearly variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of *Tradescantia* clone KU 9 grown outdoors, which showed a significant increase after the Chernobyl accident**. Mutation Research, v. 349, p. 249-259, 1996.

L'ANNUNZIATA, Michael F. (Ed.). **Handbook of radioactivity analysis**. Academic press, 2012.

LONGHI, 2020 **O Uso de *Tradescantia Pallida* como um Bioindicador da Poluição Atmosférica em Perícia Ambiental**. V. 2 p,537-539.

LOWER, W. R.; YANDERS, A. F.; MARRERO, T. R.; UNDERBRINK, A. G.; DROBNEY, V. K.; COLLINS, M. D. **Mutagenicity of bottom sediment from a water reservoir**. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 4, p. 13-19, 1989.

MA, T. H. ***Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening**, Environ. Health Perspect., 37 (1981) 85–90.

MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CHEN, R.; GILL, B. S.; SANDHU, S. S.; VANDENBERG, A. L.; SALAMONE, M, F. ***Tradescantia* micronucleus bioassay**. Mutation Research, v. 310, n. 2, p. 221-230, 1994b.

MANNING, W.J.; FEDER, W.A. **Biomonitoring air pollutants with plants**. Applied Science Publishers. 142pp, 1998.

MAIA, NILSON BORLINA; MARTOS, Henry Lesjak; BARRELLA, Walter (orgs) **Indicadores Ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: EDUC/COMPED/INEP;2001.

MONARCA, S., RIZZONI, M., GUSTAVINO, B., ZANI, C., ALBERTI, A., FERETTI, D.; ZERBINI, I. **Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests**, *Environ. Mol. Mutagen.*, 41(2003) 353–359.

MORRISON, R.M. **An Economic Analysis of Electron Accelerators and Cobalt-60 for Irradiating Food**. United States Department of Agriculture, June 1989. (Technical BuUetinn. 1762).

MINOUFLET, M., AYRAULT, S., BADOT, P. M., COTELLE, S. AND FERARD, J. F. **Assessment of the genotoxicity of 137Cs radiation using Vicia micronucleus, Tradescantia-micronucleus and Tradescantia-stamen-hair mutation bioassays**, *J. Environ.Radioact.*, 81 (2005) 143–153.

MERCIA F. CARVALHO; SORAYA G. EL-DEIR; MARCUS M. CORRÊA; GIAN C. **Carvalho Estudo de caso de três espécies de plantas bioindicadoras de solos salinos.20015**

NASTRO, V.*et al* **Passive and active methods for Radon pollution measurements in historical heritage buildings**. *Measurement*, v. 114, p. 526-533, 2018.

NAYAR, G. G.; S P A R R O W, A. H. **Radiation-induced somatic mutations and the loss of reproductive integrity in Tradescantia stamen hairs**. *Radiation Botany*, v. 7, p. 257-267, 1967.

PLEWA, M. J. **Specific-locus mutation assays in Ziamets. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program**, *Mutation Research*. 99 (1982) 317–337

ROCHA, Candido; L S, PEREIRA JG, SILVA CAM, SILVA SV, MUSSURY RM. **Evaluation of vehicular pollution using the TRAD-MCN mutagenic bioassay with Tradescantia pallida (Complicacies)**. *Environmental Pollution*. 2018;240:440-7.

SANT’ANNA, E.T.G.,2003, “**Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero Tradescantia**”. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da USP.

SANDHU, S. S.; DE-SERRES, F. J.; GOPALAN, H. N. B.; GRANT, W . R.; SVENDSGAARD, D.; VELEMINSKY, J.; BECKING, G. C. **Environmental monitoring for genotoxicity w it plants systems: results and recommendations**. *Mutation Research*, v. 310, n. 2, p. 257-263, 1994b.

SCHAIRER, L. A.; VAN“T HOF, J.; HAYES, C. G.; BURTON, R. M.; DE SERRES, F. J. **Exploratory monitoring of air pollutants for mutagenicity activity with the Tradescantia stamen hair system**, *Environ. Health Perspect.*, 27 (1978) 51–60.

SCHAIRER, L. A.; V A N T HOF, J.; HAYES, C. C.; BURTON, R, M.; DE SERRES, F. J, **Exploratory m onitoring of air pollutants for genotoxicity activity w it Tradescantia stamen hair system**. *Environmental Health Perspectives*, √. 27, p. 51-60, 1983.

SCHELENK, D. **Necessity of defining biomarker for use in ecological risk assessments**. *Marine Pollution Bulletin*, 39, 48-53, 1999

STEGEMAN, J.J. *et al* **Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effects.** In: HUGGETT, R.J. *et al* (Ed.). **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.** Boulder: Lewis Publishers, 235p., 1992.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. **Biomonitoramento Ambiental.** In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org.). **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, p. 166-180, 2003

TOMMASINO, L. Passive sampling and monitoring of radon and other gases. **Radiation protection dosimetry**, v. 78, n. 1, p. 55-58, 1998.

UNSCEAR. **Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: Fifty-sixth Session (10-18 July 2008).** United Nations Publications, 2008.

UNDERBRINK, A. G.; SPARROW, A. H.; SAUTKULIS, D.; MILLS, R. E. **Oxygen enhancement ratios (OERs) for somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs.** *Radiation Botany*, v. 15, p. 161-168, 1975b.

VAN THOF, J.; SCHAIRER, L. A. ***Tradescantia* assay system for gaseous mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program.** *Mutation Research*, v. 99, p. 303-315, 1982.

VAN DER OOST *et al* **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.13, n.2, p. 57-149, 2003

VIG, B. K. Soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) as a short-term assay for study of environmental mutagens. **A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program**, *Mutation Research*. 99 (1982) 339–347.