



Universidade Federal de Sergipe

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia

Departamento de Física

IASMIM FONSECA SANTOS

**USO DA TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS PARA ANÁLISE DE
INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA INDUZIDA POR RADIAÇÃO
BETA EM CÉLULAS DE *ALLIUM CEPA***

ORIENTADOR: Dr^a Susana De Souza Lalic

Trabalho de Conclusão de Curso

São Cristóvão/SE

2024



Universidade Federal de Sergipe

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia

Departamento de Física

IASMIM FONSECA SANTOS

**USO DA TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS PARA ANÁLISE DE
INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA INDUZIDA POR RADIAÇÃO
BETA EM CÉLULAS DE *ALLIUM CEPA***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Física: Física Médica.

Orientador: Dr^a Susana De Souza Lalic

Trabalho de Conclusão de Curso

São Cristóvão/SE

2024

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os dias me conceder a oportunidade de lutar pelos meus sonhos.

Aos meus pais e irmãs, por todo o amor, apoio e paciência.

À minha orientadora, Dr^a Susana de Souza Lalic, por todo o apoio, ensinamentos e contribuição para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À Magno Nogueira Xavier, por me apresentar o incrível mundo da Dosimetria Citogenética e me transformar em uma apreciadora da ciência. Mas além disso, agradecer pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório de Dosimetria e Biofísica, por me proporcionarem o espaço para desenvolvimento da pesquisa e por toda ajuda para realizá-la.

À Fapitec-SE e ao CNPq, por apoiar financeiramente minhas pesquisas ao longo da graduação.

Aos amigos que fiz ao longo da graduação, em especial Alana, July Anne, John, Michael, Barbara, Layanne, Wagner, Ruan, Victória Beatryz, Mayara. Obrigada pela amizade e por tornar a jornada um pouco mais leve.

Ao projeto Física Show e a todos os participantes, em especial ao Prof. Dr. Marcos Vinicius Rezende, por abrir as portas desse projeto que foi tão importante para o meu desenvolvimento no curso.

Aos ex-residentes do HU (e agora físicos médicos especialistas em radiodiagnóstico) Caroline e Bruno, por me orientarem durante meu estágio supervisionado. Obrigada por compartilhar suas experiências e ensinamentos, vocês me proporcionaram uma maravilhosa vivência na área do Radiodiagnóstico.

Aos professores Laélia, Ana Maia, Ricardo Pinheiro, Joatan e Ronaldo. Obrigada por me deixarem boas marcas da graduação e por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos fora da graduação, em especial Tissiane, Thamires, João Marcos e Gabriel. Obrigada por todo companheirismo, apoio e por serem um porto seguro fora da UFS.

À minha psicóloga Dr^a Andrea Rabelo, que nesta reta final foi uma peça essencial para que eu conseguisse chegar até o fim.

A todos, minha gratidão.

RESUMO

A avaliação dos efeitos citogenéticos da radiação ionizante nas plantas pode desempenhar um papel fundamental para responder prontamente e/ou mitigar os impactos recorrentes da liberação de materiais radioativos no meio ambiente e, conseqüentemente, reduzir o risco para a população. O objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de exposições agudas à partículas beta para induzir instabilidade cromossômica em células de raízes de cebola (*Allium cepa*) após 3 ciclos celulares de cessadas as exposições. A escolha da *Allium cepa* se deu por ela ser uma biota frequentemente empregada como modelo padrão em estudos de citogenética relacionados a poluentes ambientais, porém, pouco explorada no contexto dos efeitos da radiação ionizante. Uma das técnicas mais utilizadas para avaliar os danos citogenéticos é o ensaio de micronúcleos, que foi aplicada nesse trabalho. Para isso, sementes de cebola foram previamente germinadas e expostas, em grupos, a uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ a doses absorvidas de 0,36, 0,72 e 1,44 Gy. Cada grupo acompanhou um grupo de controle não irradiado. Os níveis de danos citogenéticos às células de *Allium cepa* foram analisados via microscopia óptica, considerando a frequência de células com micronúcleos (FMN) e o índice mitótico (IM) ao longo de três ciclos celulares. De posse desses dados, foram realizados testes estatísticos para verificação da significância estatística. Os principais resultados mostraram claramente a influência do índice mitótico na detecção de células com MN simples e múltiplos. A dose de 0,36 Gy induziu uma diminuição gradual do IM ao longo dos três ciclos celulares investigados. Já para a dose de 1,44 Gy, não houve essa redução no primeiro ciclo pós-irradiação, mas sim nos ciclos seguintes, com reduções de 3/4 e 2/3, respectivamente, em comparação com o IM após o primeiro ciclo. Os dados sugerem que as raízes de *Allium cepa* podem se adaptar a doses mais altas, apesar de apresentarem instabilidade cromossômica em todas as doses estudadas.

Palavras-chave: *Allium cepa*; ciclo celular; micronúcleo; partículas beta.

ABSTRACT

The assessment of the cytogenetic effects of ionizing radiation on plants can play a fundamental role in promptly responding to and/or mitigating the recurring impacts of the release of radioactive materials into the environment and, consequently, reducing the risk to the population. The objective of this work was to analyze the potential of acute exposure to beta particles to induce chromosomal instability in onion (*Allium cepa*) root cells after 3 cell cycles of cessation of exposure. The choice of *Allium cepa* was due to it being a biota frequently used as a standard model in cytogenetic studies related to environmental pollutants, however, little explored in the context of the effects of ionizing radiation. One of the most used techniques to evaluate cytogenetic damage is the micronucleus assay, which was applied in this work. For this, onion seeds were previously germinated and exposed, in groups, to a source of $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ at absorbed doses of 0.36, 0.72 and 1.44 Gy. Each group followed a non-irradiated control group. The levels of cytogenetic damage to *Allium cepa* cells were analyzed via optical microscopy, considering the frequency of cells with micronuclei (FMN) and the mitotic index (MI) over three cell cycles. With these data in hand, statistical tests were carried out to verify statistical significance. The main results clearly showed the influence of the mitotic index in the detection of cells with single and multiple MN. The dose of 0.36 Gy induced a gradual decrease in IM throughout the three cell cycles investigated. For the dose of 1.44 Gy, there was no such reduction in the first post-irradiation cycle, but rather in the following cycles, with reductions of 3/4 and 2/3, respectively, compared to the IM after the first cycle. The data suggest that *Allium cepa* roots can adapt to higher doses, despite showing chromosomal instability at all doses studied.

Keywords: *Allium cepa*; beta particles; cell cycle; micronucleus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1 Faixas de predominância, em energia e número atômico, dos três tipos principais de interação de fótons com a matéria. ((Fonte: Sá <i>et al.</i> , 2017).....	11
Figura 2-2 – Representação do efeito fotoelétrico. (Fonte: https://efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br/explicação/).....	12
Figura 2-3 – Representação do espalhamento Compton. (Fonte: https://efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br/efeito-compton/).....	13
Figura 2-4 – Representação da produção de pares. (Fonte: https://www.oocities.org/tomografiademadeira/interacao.html)	13
Figura 2-5 – Estrutura da <i>Allium cepa</i> (cebola). Região em destaque: meristema apical. (Fonte: http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/praticas/mitose_cebola.pdf)	17
Figura 2-6 – Fases do ciclo celular. Interfase (fases G1, S e G2) e mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). (Fonte: https://www.biologianet.com/biologia-celular/ciclo-celular.htm)	19
Figura 2-7 – Esquema da estrutura do cromossomo e sua composição. (Fonte: https://brasilecola.uol.com.br/biologia/cromossomos-homologos.htm)	20
Figura 2-8 - Formação do micronúcleo. (Fonte: Adaptada de FENECH, 2007).....	22
Figura 3-1 Equipamento utilizado para esterilização dos materiais. (A) – Autoclave; (B)- Capela de fluxo laminar por UV-C; (C) – Materiais como dispostos para esterilização dentro da capela de fluxo laminar.	26
Figura 3-2 – Processo de germinação das sementes de <i>Allium Cepa</i> . (A) – Sementes postas na placa de petri. (B) – Placa vedada com plástico Parafilm. (C) – Parte interna e externa da incubadora BOD.	27
Figura 3-3 – Fonte emissora de partículas β colocada no suporte de acrílico para irradiação das amostras.....	28
Figura 3-4 Componentes para preparação do fixador <i>Carnoy</i> : Ácido Acético Absoluto e Álcool etílico.....	29
Figura 3-5 – Preparação das lâminas de microscopia. (A) – Processo de hidrólise das raízes em HCl. (B) – Raízes expostas a orceína. (C) – Lâminas de microscopia produzidas.	30
Figura 3-6 – Microscópio óptico Olympus BX51. (A) Vista frontal do microscópio; (B) Vista lateral do microscópio; (C) Lâmina sob a objetiva de 100 \times ; (D – E) Visualização das imagens das células com o aumento de 1000 \times (Fonte: Xavier, 2023).	31
Figura 4-1 Histogramas da evolução temporal do IM e das frequências de micronúcleos simples e múltiplos (média \pm erro padrão da média) em células de <i>Allium cepa</i> irradiadas com partículas	

beta. A) grupo controle (não irradiadas); B) Amostras irradiadas com 360 mGy; C) Amostras irradiadas com 720 mGy; D) Amostras irradiadas com 1,44 Gy. 34

Figura 4-2 Histogramas da frequência de endpoints citogenéticos induzidos em células radiculares de *Allium cepa* por exposições a partículas β em A) 24 h, B) 48 h e C) 72 h pós irradiações (média \pm erro padrão da média). 37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1	Física das Radiações	10
2.1.1	Radiações indiretamente ionizantes	10
2.1.2	Radiações diretamente ionizantes	14
2.2	Partícula beta e sua interação com a matéria	15
2.3	Dose absorvida	16
2.4	Células-tronco eucarióticas e ciclo celular	17
2.4.1	Células-tronco eucarióticas	17
2.4.2	Ciclo celular eucariótico	18
2.5	Biofísica do dano cromossômico radioinduzido	19
2.6	Micronúcleos na avaliação de instabilidade cromossômica radioinduzida	21
2.7	Tratamento estatístico de dados	23
3	METODOLOGIA.....	25
3.1	Germinação de sementes de <i>Allium cepa</i>	25
3.2	Irradiação com partículas Beta.....	27
3.3	Fixação das amostras	28
3.4	Produção de Lâminas.....	29
3.5	Determinação das frequências de aberrações cromossômicas (ACs), micronúcleos (MNs) e índice mitótico (IM)	30
3.6	Análise estatística	31
3.7	Investigação da resposta de MNs em função do tempo.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5	CONCLUSÕES	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

O uso das radiações ionizantes está cada vez mais presente no cotidiano através das inúmeras aplicações em diversas áreas, sendo elas a medicina, biologia, farmácia, indústria, agricultura, na geração de energia etc. Apesar disso, há um amplo consenso na comunidade científica sobre a necessidade de aprofundar a compreensão da biofísica envolvida nos processos de indução de danos biológicos em situações de exposição não desejada a doses baixas e moderadas (Tang, Loganovsky, 2018).

Para mensurar esses danos, são utilizadas técnicas de dosimetria, mais especificamente, a dosimetria biológica. A dosimetria citogenética é uma técnica que relaciona a frequência das respostas induzidas pela radiação ionizante nas células e a dose absorvida (IAEA, 2011). Essa dosimetria foi desenvolvida a princípio para ser aplicada como um procedimento em proteção radiológica e a sua utilização tem sido recomendada nos casos de exposição acidentais à radiação (IAEA, 1986).

Diante dos acidentes nucleares ao longo dos anos, a Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP, acrônimo do inglês *International Commission On Radiological Protection*) reconheceu a necessidade de fornecer mais conselhos quantitativos também sobre proteção ambiental. Uma avaliação necessária é uma correlação entre a dose e seus efeitos em biota vegetal (Higley, 2018). Uma das biotas vegetais que vem recebendo um considerável destaque nesse ramo da dosimetria é a planta superior *Allium cepa*.

A cebola (*Allium cepa*) é um indicador biológico amplamente aplicável a vários estressores e contaminantes, especialmente, químicos. Essa espécie apresenta correlações significativas com outros sistemas e permite a realização de testes rápidos, simples e reproduzíveis em diferentes escalas, tanto macroscópicas quanto microscópicas (Fiskesjö, 1985). Portanto, não é surpreendente que possam existir testes específicos utilizando as raízes de *Allium cepa* para avaliar a presença de contaminantes radioativos.

Para avaliar os danos radioinduzidos nas células de cebola foi utilizado o ensaio de micronúcleos que é um dos principais métodos citogenéticos empregados na avaliação de danos no DNA. Os micronúcleos são formados quando cromossomos inteiros e/ou fragmentos cromossômicos não conseguem migrar para os polos das células filhas durante a fase da telófase da divisão celular, resultando em estruturas adicionais de material genético não incorporadas ao núcleo principal (Leme, Marin-Morales, 2009).

A frequência de células com micronúcleos ao longo do tempo pode fornecer informações valiosas sobre a resposta biológica a danos genéticos. Ao acompanhar como essa

frequência varia após a exposição a agentes genotóxicos, torna-se melhor o entendimento da eficácia dos mecanismos de reparo do DNA e a persistência dos danos ao longo do tempo (Leme, Marin-Morales, 2009).

Com isso, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a frequência de células com MN induzidos por partículas beta em células meristemáticas de *Allium cepa*, analisando a evolução desses *endpoints* ao longo de três ciclos celulares (24, 48 e 72 horas), e também investigar o comportamento do índice mitótico durante esses intervalos de tempo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção, é apresentada a base teórica fundamental do presente trabalho. Conceitos de física das radiações, biologia celular, interação da radiação com a matéria e tratamentos estatísticos são apresentados para melhor compreensão do desenvolvimento do trabalho.

2.1 Física das Radiações

Existem átomos na natureza que são instáveis. A instabilidade de um núcleo pode se dar a três fatores: quando o número de nêutrons é incompatível com o número de prótons correspondente aquele núcleo, quando o número de prótons é alto, impossibilitando a força nuclear forte de manter os prótons unidos dentro do núcleo e quando o tamanho do núcleo é grande, tornando-se mais propenso a sofrer uma desintegração nuclear. Na tentativa de se estabilizar, o núcleo libera energia, e esta é chamada de radiação (Bitelli, 2006).

Radiação é a forma de energia que se propaga a partir de uma fonte emissora através de qualquer meio, sendo caracterizada como energia em movimento (Okuno, 2013). Essa energia pode ser classificada como ionizante, quando tem a capacidade de ionizar um átomo, ou seja, retirar um elétron da sua órbita, ou não ionizante, quando não tem a capacidade de ionização, mas pode causar uma excitação no átomo ou em moléculas do meio. Os tipos de radiações ionizantes mais estudadas podem ser classificados como radiação eletromagnética, como raios X e gama, e radiações corpusculares, como alfa e beta.

2.1.1 Radiações indiretamente ionizantes

Exemplos de radiações indiretamente ionizantes são os fótons de raios X e raios gama. Os raios X se originam através de desexcitações atômicas e de desaceleração de partículas carregadas, ambos os processos são chamados de raios X característicos e *Bremsstrahlung* (radiação de freamento), respectivamente. Os raios gama, por sua vez, têm seu surgimento através de processos de decaimento nuclear, com a transição de um nucleon para um nível menos energético. Os raios gama são altamente energéticos devido sua alta frequência e, consequentemente, seu baixo comprimento de onda (L' Annuziata, 2007).

Existem vários tipos de interação das radiações indiretamente ionizantes com a matéria. Os três principais são o efeito fotoelétrico, o efeito Compton e a produção de pares (Figura 2.1).

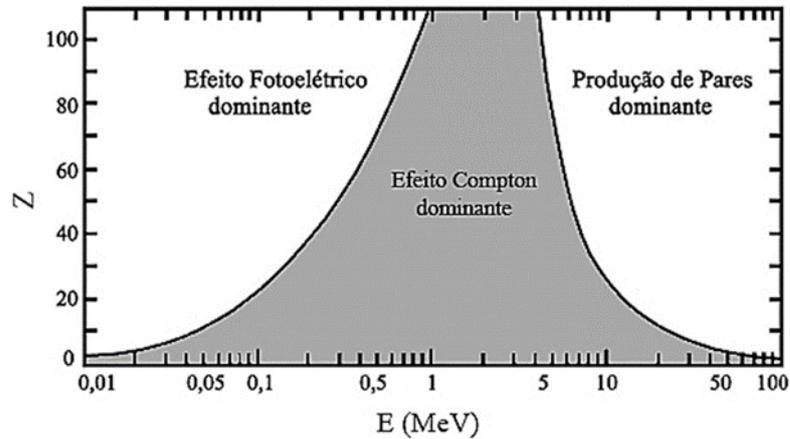


Figura 2-1 Faixas de predominância, em energia e número atômico, dos três tipos principais de interação de fótons com a matéria. ((Fonte: Sá *et al.*, 2017)

O efeito fotoelétrico é caracterizado pela transferência total da energia do fóton incidente para um elétron, que é ejetado do átomo com uma energia cinética definida pela equação 2.1. Ocorre predominantemente em átomos com número atômico alto e com fótons de baixa energia. Para que ocorra o efeito fotoelétrico, a energia do fóton incidente deve ser maior ou igual à energia de ligação do elétron que é ejetado. O elétron ejetado é provavelmente aquele cuja energia de ligação é mais próxima, mas menor, da energia do fóton incidente (Bushberg, 2012).

$$E_c = h\nu - E_{lig} \quad (2.1)$$

onde E_c é a energia cinética, h é a constante de Planck, ν é a frequência da radiação e E_{lig} é a energia de ligação do elétron orbital.

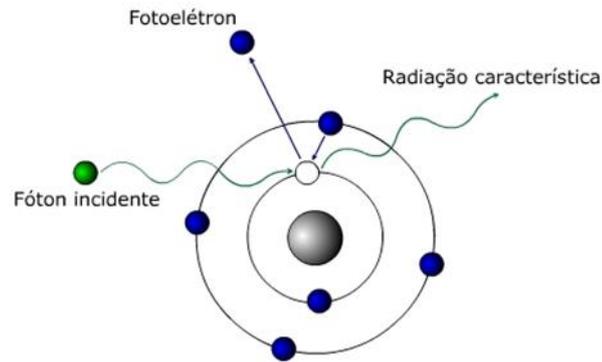


Figura 2-2 – Representação do efeito fotoelétrico. (Fonte: <https://efeitofotoeletricoecompton.webnocde.com.br/explicação/>)

O espalhamento Compton (também chamado de espalhamento inelástico) é o espalhamento predominante na interação de fótons de raios X e raios gama na faixa de energia diagnóstica com tecidos moles. O elétron é ejetado do átomo e o fóton espalhado é emitido com alguma redução na energia relativa ao fóton incidente. Tal como acontece com todos os tipos de interações, tanto a energia quanto o momento devem ser conservados (Bushberg, 2012). O espalhamento Compton é caracterizado pela equação 2.2.

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \left[\frac{h\nu}{m_0c^2(1 - \cos \theta)} \right]} \quad (2.2)$$

onde $h\nu$ é a energia do fóton incidente, $h\nu'$ é a energia do fóton espalhado, m_0c^2 é a energia de repouso do elétron e θ é o ângulo formado entre o fóton incidente e o espalhado.

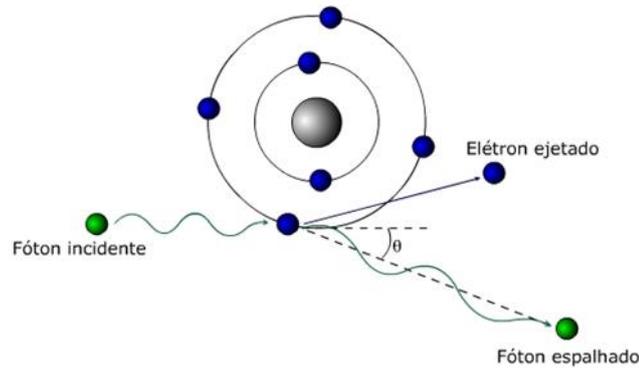


Figura 2-3 – Representação do espalhamento Compton. (Fonte: <https://efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br/efeito-compton/>)

A produção de pares só pode ocorrer quando as energias dos raios X e dos raios gama excedem 1,022 MeV. Na produção de pares, um raio X ou raio gama interage com o campo elétrico do núcleo de um átomo. A energia do fóton é transformada em um par elétron-pósitron. A energia resultante equivalente de cada elétron é 0,511 MeV, e é por isso que o limite de energia para esta reação é 1,022 MeV. A energia do fóton em excesso é transmitida ao elétron (também conhecido como partícula beta menos) e ao pósitron como energia cinética. O elétron e o pósitron perdem sua energia cinética via excitação e ionização do meio. Quando o pósitron chega ao repouso, ele interage com um elétron carregado negativamente, resultando na formação de dois fótons de aniquilação de 0,511 MeV direcionados de forma oposta (Bushberg, 2012).

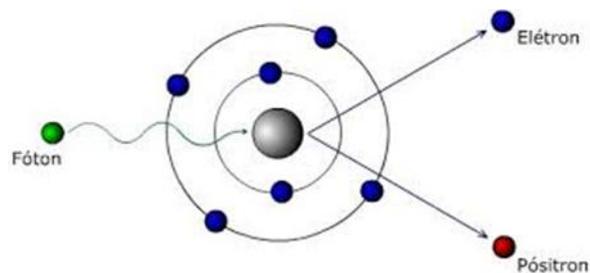


Figura 2-4 – Representação da produção de pares. (Fonte: <https://www.oocities.org/tomografiademadeira/interacao.html>)

2.1.2 Radiações diretamente ionizantes

Exemplos de radiações diretamente ionizantes, leves ou pesadas, são as partículas alfa e beta, também chamadas de radiações ionizantes do tipo corpusculares. A partícula alfa consiste em um núcleo de hélio, composto por dois prótons e dois nêutrons. As partículas alfa são emitidas por núcleos atômicos pesados através de decaimentos radioativos. As principais características das partículas α são o alto poder de ionização que, por consequência, possui uma alta LET (do inglês, *Linear Energy Transfer*), tendo o poder de depositar altas quantidades de energia no meio de interação num volume pequeno. Contudo, as partículas α possuem baixo poder de penetração na matéria, podendo ser atenuadas por uma folha de papel (Brückmann, 1991; Bowler *et al.*, 2006).

A respeito da interação com o tecido humano, as partículas α são incapazes de ultrapassar a espessura da pele, sendo facilmente bloqueadas por células mortas da epiderme. Em contraste, a exposição interna a partículas alfa é extremamente perigosa. Nesse caso, sua alta LET causa danos severos ao DNA, podendo levar a mutações e distúrbios celulares, incluindo o desenvolvimento de câncer (Tauhata *et al.*, 2003).

Ao contrário da radiação indiretamente ionizante, as radiações com carga elétrica sempre interagem com o meio devido às sucessivas interações coulombianas com as cargas nele distribuídas. Consequentemente, após múltiplas interações que resultam na perda de energia, a partícula incidente é absorvida pelo meio e perde sua capacidade ionizante. A natureza dessa interação é influenciada por diversos parâmetros, incluindo a carga elétrica, velocidade, massa da partícula incidente e o parâmetro de impacto (distância entre a trajetória da partícula incidente e o raio atômico) (Attix, 1986; Okuno; Yoshimura, 2010).

As principais interações das partículas carregadas se dão com as camadas eletrônicas, mas também pode ocorrer com o núcleo do átomo. As interações podem ser classificadas como colisão inelástica com o átomo (colisão suave) ou com um elétron fortemente ligado (colisão dura), colisão elástica com o núcleo, aniquilação do pósitron e reações nucleares (Okuno, Yoshimura, 2009).

2.2 Partícula beta e sua interação com a matéria

A partícula β possui mesma carga (em módulo) e massa de um elétron, diferenciando apenas na sua origem. O elétron se origina das camadas eletrônicas encontradas fora do núcleo atômico, enquanto a partícula beta é emitida diretamente do núcleo através de decaimentos radioativos (Bitelli, 2006).

Ao ser emitida, a partícula β pode ser classificada de acordo com sua carga elétrica. Durante um decaimento radioativo, o núcleo pode sofrer alterações em sua estrutura. No decaimento β^- , o núcleo sofre uma desestabilidade causada pelo excesso de nêutrons em sua composição. Esse fenômeno resulta na conversão de um nêutron em um próton dentro do núcleo, onde o equilíbrio de carga é conservado através da formação de um elétron e um anti-neutrino (Young; Freedman, 2009). Nesse caso, a partícula beta emitida é o elétron. A relação pode ser observada na equação 2.3.



Para o decaimento β^+ , temos um núcleo instável com razão N/Z muito pequena para que haja a estabilidade. Como resultado dessa desestabilidade nuclear, há a transformação de um próton em um nêutron. Analogamente ao decaimento β^- , o equilíbrio de carga é conservado através da produção de um pósitron (anti-partícula do elétron) e um neutrino. (Young; Freedman, 2009). Nesse caso, a partícula beta emitida é o pósitron. Mas para essa emissão é necessário haver disponibilidade energética de pelo menos 1,022 MeV. A relação pode ser observada na equação 2.4.



Existem alguns nuclídeos em que não é possível energeticamente emitir uma partícula β^+ . Quando a disponibilidade energética é insuficiente para a emissão do pósitron, há um terceiro tipo de decaimento, chamado de captura eletrônica. Neste caso, um elétron orbital, geralmente da camada mais interna, pode se combinar com um próton do núcleo resultando na emissão de um nêutron e um neutrino (Young; Freedman, 2009). Nesse caso, não haverá emissão de partícula beta, apenas de neutrino. O processo é descrito na equação 2.5.



Uma das principais formas de interação dos elétrons com a matéria é através da colisão suave (ou inelástica). Esse tipo de interação ocorre quando há um grande parâmetro de impacto envolvido. Durante essa interação, o átomo como um todo ou seus elétrons da camada de valência são afetados. Isso leva à excitação do átomo e ocasionalmente à sua ionização. Essa forma de interação é bastante frequente e contribui significativamente para a perda de energia das partículas incidentes. Tanto elétrons como pósitrons e íons pesados são capazes de desencadear esse tipo de interação (Yoshimura, 2009).

Os elétrons β dissipam sua energia ao causar ionizações durante sua interação com a matéria. No entanto, também podem perder energia através de radiação de frenagem. Devido à sua massa relativamente baixa, a trajetória dos elétrons no meio material geralmente é irregular e pode ser desviada de sua direção original (Attix, 1986; Podgorsak, 2005).

2.3 Dose absorvida

A dose absorvida (D) é uma grandeza física definida como a quantidade de energia de radiação ionizante (dE) depositada por unidade de massa (dm) no meio de interação. Sua unidade de medida no Sistema Internacional (SI) é o gray (Gy), equivalente a J/kg. A dose absorvida pode ser calculada para qualquer tipo de radiação em interação com qualquer meio (Okuno, Yoshimura, 2010). A dose absorvida é definida pela equação 2.6.

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (2.6)$$

A energia depositada pelas radiações ionizantes pode causar danos biológicos às células e tecidos, portanto, é importante quantificar essa interação da radiação com o meio para fins de proteção radiológica.

2.4 Células-tronco eucarióticas e ciclo celular

2.4.1 Células-tronco eucarióticas

Células-tronco ou células primordiais são tipos celulares, presentes em animais e plantas, que têm a capacidade de se dividir e manter seu próprio grupo de células morfologicamente indiferenciadas. Também possuem a habilidade de formar células derivadas, que então, se diferenciam e formam tecidos e órgãos (Tucker, Laux 2007).

Apesar da existência de células-tronco em animais e plantas, ambas possuem funções distintas. Nos animais, as células primordiais têm como principal função, compensar perdas celulares durante o desenvolvimento pós-embriônico. Nas plantas, as células-tronco atuam como uma fonte contínua de células que participam na formação de novas estruturas ao longo de toda a vida da planta (Vernoux, Benfey, 2005).

Nas plantas, existe um tecido chamado meristema. Essa região é responsável por produzir as células primordiais, tendo em vista que essa região possui as premissas de divisão celular assimétrica, sendo essa responsável pela diferenciação das células, conectada à auto proliferação (Knoblich, 2008).

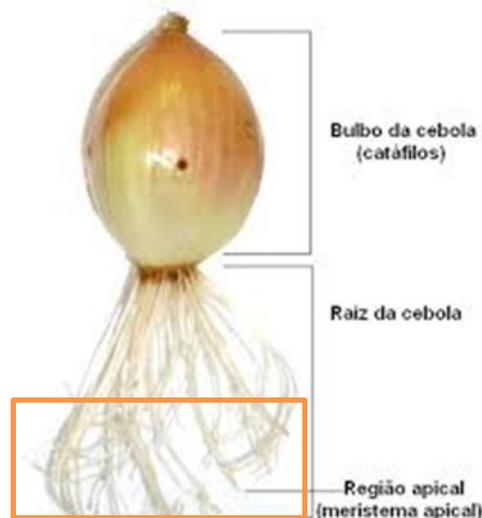


Figura 2-5 – Estrutura da *Allium cepa* (cebola). Região em destaque: meristema apical.

(Fonte: http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/praticas/mitose_cebola.pdf)

2.4.2 Ciclo celular eucariótico

O ciclo celular é a base fundamental para formação dos organismos vivos. É a partir da divisão celular que surge cada vez mais novas células que assumem diversas funcionalidades nos seres vivos. Além de originar novas células, o ciclo celular tem o papel de assegurar que o processo ocorra de forma segura, garantindo que não haja falhas nas fases de divisão celular (Lomanto *et al.*, 2003). A divisão celular é dividida em dois momentos importantes: a interfase, que se subdivide em fase G1, S e G2, e a mitose que se divide em prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Na fase G1, também conhecida como primeira fase de crescimento da célula, ocorre um período de atividade bioquímica intensa. Essa fase é responsável pela síntese do RNA e da produção de proteínas necessárias para o crescimento e desenvolvimento da célula. Na fase S, ou fase de síntese, ocorre a duplicação do DNA da célula. Ao final do processo, a célula terá o dobro de fitas de DNA e proteínas nucleares, garantindo que, posteriormente, as células-filhas tenham uma cópia completa do DNA. Por fim, na fase G2, segunda fase de crescimento celular, a célula começa a se preparar para o processo de divisão mitótica. Nesta etapa, se incrementam as proteínas citoplasmáticas e organelas, sendo possível observar mudanças na estrutura da célula devido ao seu aumento de tamanho (Fragoso *et al.*, 2004).

A mitose é a fase de divisão do núcleo celular, permitindo que, no final de todo o processo de divisão celular, gere mais duas células filhas idênticas. A primeira fase da mitose, chamada prófase, é caracterizada pela condensação da cromatina em cromossomos bem definidos, tornando-os visíveis. Dois pares de centríolos, denominados de centrossomas, se direcionam para polos opostos, formando um fuso acromático. No caso das plantas, esses fusos são multipolares por não possuírem centrômeros. Na segunda fase da divisão celular, a metáfase, os cromossomos assumem seu nível de maior condensação. Esses cromossomos se alinham no centro do fuso acromático formando a chamada placa equatorial. Neste momento, os cromossomos se preparam para se separarem na fase seguinte. Na anáfase, ocorre a divisão pelo centrômero dos cromossomos, iniciando uma ascensão polar, fazendo com que, ao final da anáfase, dois conjuntos iguais de cromossomos estejam em cada polo da célula. Na quarta e última fase do ciclo celular, a telófase, dá-se início a organização dos núcleos das células-filhas. As fibras do fuso acromático se desorganizam fazendo com que os cromossomos comecem a se descondensar e, então, tornar-se indistintos. Após a fase da telófase existe um processo chamado de citocinese, onde ocorre a divisão do citoplasma. Ao final dessa fase o nucléolo é

reconstituído e o ciclo celular recomeça com as células-filhas entrando na fase de interfase (Moreira, 2015). As fases do ciclo celular são ilustradas na Figura 2.6.

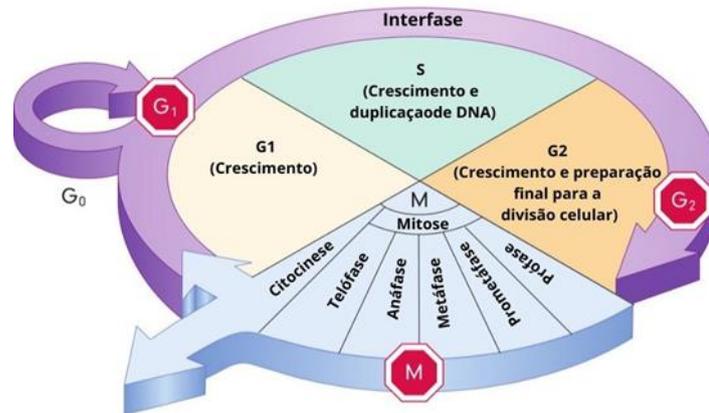


Figura 2-6 – Fases do ciclo celular. Interfase (fases G1, S e G2) e mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). (Fonte: <https://www.biologianet.com/biologia-celular/ciclo-celular.htm>)

2.5 Biofísica do dano cromossômico radioinduzido

Os cromossomos (Figura 2.7) são estruturas compostas por DNA e proteínas localizadas no núcleo das células eucarióticas. Eles são portadores dos genes, os quais contêm as informações genéticas necessárias para o desenvolvimento, funcionamento e reprodução dos organismos. Cada espécie tem um número característico de cromossomos que é mantido constante de geração em geração. Os cromossomos são essenciais para o processo de divisão celular, pois eles se duplicam e são distribuídos de forma precisa durante a divisão celular, garantindo que cada célula-filha receba uma cópia completa do material genético (IAEA, 2011).

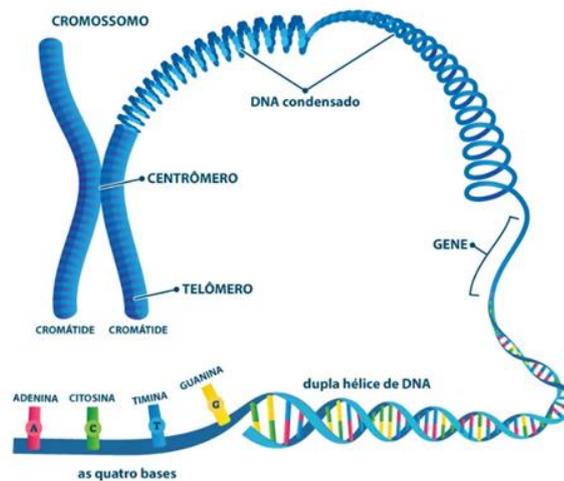


Figura 2-7 – Esquema da estrutura do cromossomo e sua composição. (Fonte: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/cromossomos-homologos.htm>)

A exposição a radiações ionizantes pode resultar na remoção de elétrons das moléculas presentes nos tecidos biológicos. Embora diversos tipos de danos possam ser causados em várias estruturas celulares, o principal alvo é o DNA, que pode ser afetado tanto diretamente pela radiação quanto indiretamente. A ação indireta das radiações ionizantes sobre o DNA ocorre devido à presença predominante de água nos organismos biológicos. Quando as células são irradiadas, a água nelas pode passar por radiólise, levando à quebra da molécula em pares de íons, os quais, ao se recombinarem eletronicamente com o ambiente, podem gerar radicais livres (H^+ e OH^-). Devido à sua alta reatividade, essas espécies podem interagir quimicamente entre si ou com moléculas próximas. Como resultado, novas moléculas, incluindo o DNA, podem ser danificadas, resultando em quebras simples ou duplas de suas cadeias (Podgorsak, 2005; Bushong, 2010; IAEA, 2011).

Diferentes tipos de radiação ionizante requerem diferentes níveis de dose para produzir um mesmo efeito. Portanto, a RBE (do inglês, *Relative Biological Effectiveness*) é uma medida adimensional que possibilita a comparação da quantidade de dose necessária para alcançar o mesmo efeito (*endpoint*) com diferentes tipos de radiação (Podgorsak, 2005; Bushong, 2010; IAEA, 2011). A RBE pode ser expressa pela equação 2.7.

$$RBE = \frac{Dose_{referência}}{Dose_{teste}} \quad (2.7)$$

A influência da RBE está implicitamente ligada à LET da radiação. No entanto, outros parâmetros como a dose, taxa de dose, fracionamento da dose e tipo de material biológico também influenciam o tipo de resultado analisado e, conseqüentemente, afetam os valores da RBE (Podgorsak, 2005; Bushong, 2010; IAEA, 2011).

Vários fatores podem influenciar a sensibilidade das células à radiação, incluindo o tipo de célula, o estágio do ciclo celular, a LET, a dose e a taxa de dose de radiação, bem como a capacidade de reparo do DNA. As células em fase ativa na mitose tendem a ser mais sensíveis à radiação devido à sua alta atividade metabólica e divisão celular, como exemplo das células sanguíneas e do trato gastrointestinal. Além disso, células com deficiências no reparo do DNA ou com capacidade de reparo reduzida são mais propensas a sofrer danos causados pela radiação ionizante (Podgorsak, 2005; Bushong, 2010; IAEA, 2011).

A indução de *endpoints* citogenéticos, como a formação de micronúcleos, também pode ser influenciada pela sensibilidade das células à radiação. A presença de micronúcleos é um indicador valioso na detecção de danos ao DNA, sendo utilizada a frequência de sua formação para avaliar a extensão dos danos causados pela radiação. A taxa de formação de micronúcleos pode variar conforme o tipo de célula e outros parâmetros físicos que afetam a sensibilidade celular à radiação, como a LET, a dose e a taxa de dose (IAEA, 2011).

2.6 Micronúcleos na avaliação de instabilidade cromossômica radioinduzida

A energia transportada pelas radiações ionizantes afeta estruturas biológicas ao ser absorvida durante seu percurso através do meio. À medida que os átomos se ionizam, a dinâmica das moléculas que compõem um material pode sofrer mudanças substanciais. Essas alterações podem levar a disfunções celulares, podendo, em última instância, provocar mutações e/ou desenvolver um câncer (Xavier, 2018).

Micronúcleos (Figura 2.8) são estruturas originadas de fragmentos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante a divisão celular. Suas características principais para identificação são seu formato circular, sua localização, sendo ela próxima ao núcleo principal, e seu tamanho com aproximadamente 1/3 do tamanho do núcleo da célula (Uchôa, Magalhães, 2020).

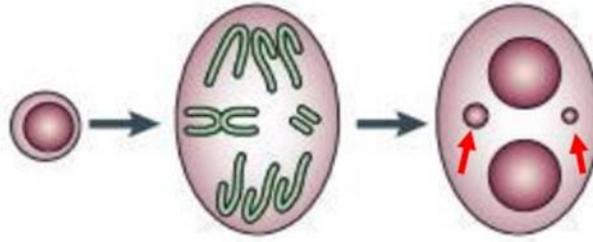


Figura 2-8 - Formação do micronúcleo. (Fonte: Adaptada de FENECH, 2007).

A presença de micronúcleos nas células pode ser um indicativo de instabilidade cromossômica, que pode ser causada por vários fatores, incluindo a exposição à radiação ionizante (Sommer *et al.*, 2020). Com o poder de danificar informações genéticas das células, as radiações ionizantes podem ser potencialmente genotóxicas. Os micronúcleos podem surgir de aberrações cromossômicas, que por sua vez, são manifestações primárias aos danos causados pela exposição à radiação (IAEA, 2011).

A identificação e quantificação dos micronúcleos nas células nos dá informações sobre os danos induzidos no DNA. Danos genéticos podem resultar de substâncias clastogênicas ou aneugênicas. Os agentes clastogênicos rompem o DNA, causando a liberação de fragmentos cromossômicos, enquanto os agentes aneugênicos liberam cromossomos inteiros. A radiação ionizante é capaz de induzir efeitos clastogênicos e aneugênicos, que podem ser detectados pelo teste do micronúcleo (Eastmond, Tucker, 1989).

O teste de micronúcleos é capaz de detectar o aumento na frequência de mutações em células expostas a uma variedade de agentes genotóxicos. Diversos estudos confirmam a eficácia desse teste como um indicador de danos citogenéticos. Além disso, o teste é considerado uma abordagem rápida, econômica e não invasiva, que pode ser repetida várias vezes para a prevenção e monitoramento de indivíduos em relação a riscos carcinogênicos (Carvalho *et al.*, 2002).

Diante dos acidentes nucleares ao longo dos anos, bem como do aumento das exposições ocupacionais, há um consenso na comunidade científica sobre a necessidade de fornecer conselhos sobre proteção radiológica humana e ambiental. abordagem alternativa e/ou complementar consiste em estabelecer uma correlação entre a dose absorvida e seus efeitos na biota não humana (Higley, 2018).

Neste quesito, uma das biotas mais utilizadas para estudos de agentes genotóxicos é a planta *Allium cepa* (cebola). Essa espécie é altamente sensível a uma ampla gama de agentes

genotóxicos, incluindo poluentes do ar, água e solo. Quando exposta a substâncias que causam danos ao DNA, a cebola demonstra respostas visíveis e mensuráveis, como a formação de micronúcleos (Leme *et al.*, 2018).

O tamanho do micronúcleo (MN) pode ser um indicador eficaz para avaliar os efeitos clastogênicos e aneugênicos em *Allium cepa*, considerando que essa espécie possui um cariótipo simétrico, caracterizado por uma homogeneidade no tamanho dos cromossomos, os quais são poucos e grandes ($2n = 16$) (Leme *et al.*, 2018).

2.7 Tratamento estatístico de dados

Durante uma análise estatística, um passo importante é verificar a normalidade dos dados para evitar interpretações e conclusões precipitadas. Esse teste é caracterizado como uma distribuição normal, ou gaussiana; um grupo amostral que apresenta valores simetricamente distribuídos em torno de uma média central apresentando uma curva em formato de sino. A área abaixo dessa curva demonstra a probabilidade de ocorrência de um fenômeno. Com isso, temos que a probabilidade de uma área observável estar entre dois pontos é justamente a área abaixo da curva desses pontos (Walpole *et al.*, 2012).

Numericamente, a normalidade de dados pode ser calculada através de testes estatísticos presentes em softwares. Os testes mais utilizados para verificar normalidade são *D'Agostino - Paerson*, *Shapiro - Wilk*, e o de *Kolmogorov - Smirnov*. A escolha entre cada um dos testes diz respeito a uma maior ou menor significância estatística, com alguns requisitos a exemplo do tamanho da amostra analisada (Walpole *et al.*, 2012).

A significância estatística está vinculada à rejeição da hipótese nula, a qual é uma afirmação inicial que supõe a inexistência de uma diferença significativa entre dois grupos ou variáveis em análise. A rejeição da hipótese nula ocorre quando temos um mínimo de $p < 0,05$, que representa a probabilidade de existir um resultado igual ou próximo a ele (Walpole *et al.*, 2012). Isso significa que, quando um dado experimento apresentar um valor de $p < 0,05$ se ele for realizado 100 vezes, todos eles sob condições idênticas, haveria uma probabilidade de 95% de obter um resultado igual ou semelhante, sendo que os 5% restantes representam as possíveis flutuações estatísticas (Xavier, 2023). Dessa forma, o valor de p avalia as evidências contrárias a hipótese nula e determina se o resultado observado possui significância estatística.

Após confirmar a normalidade dos dados, é viável aplicar testes que identificam e comparam a significância estatística entre os grupos amostrais analisados. Um dos testes

estatísticos destacados nesse contexto é a ANOVA. Esta ferramenta estatística baseia-se na análise de variância entre os grupos amostrais, sendo amplamente utilizada para fins de comparação entre três ou mais grupos de amostras independentes. Este teste opera com um nível de significância de $\rho < 0,05$.

Isso significa que se esse valor for obtido em um experimento, quer dizer que pelo menos um par de medidas apresentará diferenças. O teste de ANOVA não indica quantas ou quais medidas apresentaram diferenças. Para esse tipo de análise é utilizado um outro teste estatístico chamado Tukey, que é comumente utilizado para tal propósito (Walpole *et al.*, 2012). Em resumo, o teste *Tukey* compara todos os possíveis pares de medidas e aponta qual deles apresentou diferenças estatisticamente significativas. Esses testes são importantes para entender as disparidades entre grupos e seus impactos nos resultados de estudos científicos.

3 METODOLOGIA

Nesta seção, é apresentado o passo a passo dos métodos aplicados no desenvolvimento do trabalho, detalhando os procedimentos e ferramentas utilizadas para alcançar os objetivos do trabalho. A metodologia foi realizada com base no trabalho de (Xavier, 2023).

3.1 Germinação de sementes de *Allium cepa*

Para experimentos que utilizam material biológico, é de suma importância garantir que, tanto os materiais utilizados, quanto o ambiente em que é realizado os experimentos, estejam devidamente limpos e livres ao máximo de fungos e bactérias. Para isso, materiais como placas de Petri, pinças, ponteiros de plástico, béqueres, papel filtro de germinação e garrafas com água destilada, foram submetidos a um processo de assepsia. Esta etapa foi realizada através do uso de um equipamento chamado autoclave. A autoclavagem é um tratamento térmico que consiste em manter o material a ser descontaminado a uma temperatura elevada, através do contato com vapor de água, durante um período de tempo suficiente para eliminar ao máximo os agentes patogênicos. Em nosso laboratório, esse processo padrão de funcionamento foi realizado sob uma pressão de 1 atm e em temperatura de 121°C.

Na sequência, o processo de manuseio do material autoclavado e das sementes de cebola para a germinação foi realizado em uma cabine de fluxo laminar. Este ambiente foi previamente limpo com álcool 70% e posteriormente exposto à luz UV-C com comprimento de onda $\lambda = 254 \text{ nm}$. Também conhecida como luz UV-C germicida, ela tem como principal função desinfetar ambientes, como laboratórios, salas hospitalares etc., e também atua na desinfecção de superfícies em geral (Souza. 2020, 2022). Os ambientes do processo de assepsia são mostrados na Figura 3.1.

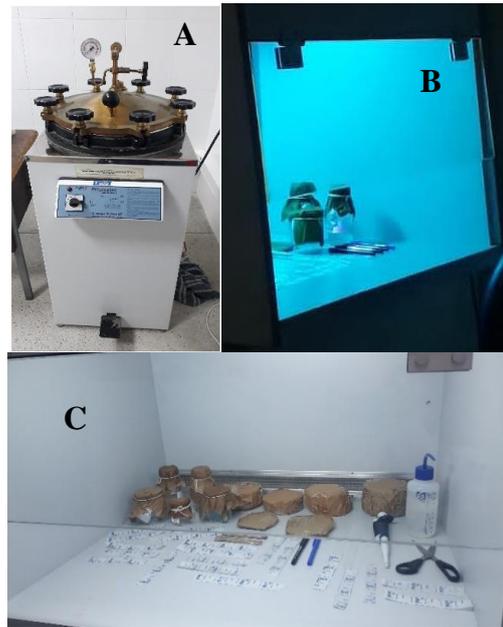


Figura 3-1 Equipamento utilizado para assepsia dos materiais. (A) – Autoclave; (B)- Capela de fluxo laminar com lâmpada que emite luz UV-C; (C) – Materiais dispostos para esterilização dentro da capela de fluxo laminar.

As sementes de *Allium cepa* utilizadas para germinação foram do tipo Baia Periform e livres de agrotóxicos. Em uma cabine de fluxo laminar previamente exposta à luz UV- C, cerca de 25 sementes foram distribuídas em placas de Petri cobertas por uma dupla camada de papel filtro de germinação e, em seguida, foram adicionados 4 mL de água destilada. Posteriormente as placas foram vedadas com plástico Parafilm® e armazenadas em uma estufa incubadora BOD (do inglês, *Biochemical Oxygen Demand*) à temperatura de $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, livres de luz solar e umidade externas. As sementes foram mantidas na incubadora até completarem 5 ciclos celulares, tendo em vista que o ciclo celular da *Allium cepa* tem a duração de 24 h (Vaijapurkar *et al.*, 2001). Após esse período, eram visíveis os meristemas desenvolvidos nas sementes. As etapas descritas podem ser visualizadas na Figura 3.2.

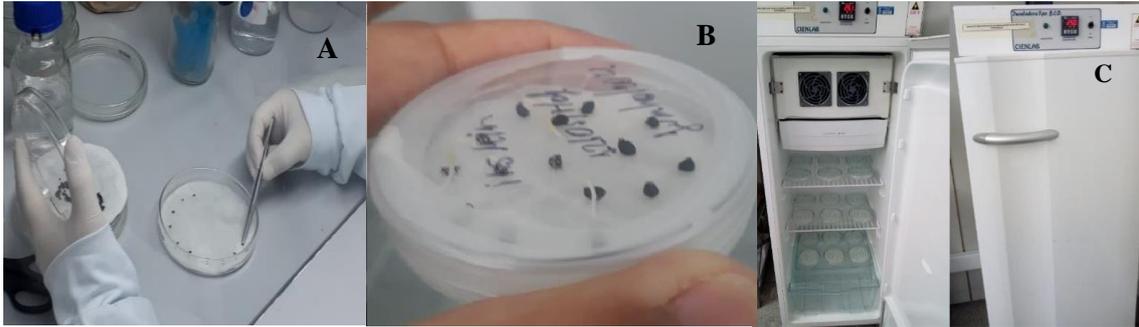


Figura 3-2 – Processo de germinação das sementes de *Allium cepa*. (A) – Sementes postas na placa de Petri. (B) – Placa vedada com plástico Parafilm. (C) – Parte interna e externa da incubadora BOD.

3.2 Irradiação com partículas Beta

As irradiações das amostras com partículas beta foram realizadas utilizando uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ (Figura 3.3) do tipo aplicador dermatológico planar com taxa de dose de $63,1 \text{ mGy}\cdot\text{min}^{-1}$. Essa taxa de dose foi calculada através de simulação computacional de Monte Carlo apresentada no trabalho de (Xavier, 2023). Após as raízes de *Allium cepa* crescerem até um tamanho aproximado de $0,5 \pm 0,1 \text{ cm}$, 8 sementes com seus meristemas foram selecionados de forma aleatória e depositados num suporte de acrílico contendo uma dupla camada de papel filtro de germinação. Inicialmente, 3 grupos de amostras foram delimitados e irradiados com doses de 0,36, 0,72 e 1,44 Gy. Um grupo de sementes não irradiadas foram separadas para atuar como grupo de controle. O experimento foi realizado em triplicata, ou seja, para cada uma das 3 doses absorvidas de radiação beta foram delimitados 3 grupos de sementes. Após as irradiações, os grupos de sementes expostas a radiação, bem como o grupo de sementes não irradiadas foram depositadas em placas de Petri com uma dupla camada de papel de germinação, vedadas com plástico Parafilm e armazenadas na incubadora BOD.



Figura 3-3 – Fonte emissora de partículas β colocada no suporte de acrílico para irradiação das amostras.

3.3 Fixação das amostras

Com o intuito de estudar o comportamento das células de *Allium cepa* ao decorrer dos ciclos celulares pós irradiação, as amostras irradiadas foram coletadas em dias distintos. O primeiro grupo de amostras irradiadas com doses de 0,36, 0,72 e 1,44 Gy, respectivamente, foram coletadas com 24 h após a irradiação com partículas beta. O segundo grupo foi coletado 48 h após as irradiações e o terceiro grupo foi coletado 72 h após as exposições a radiação beta. As raízes foram retiradas das placas de Petri e levadas para serem fixadas usando fixador *Carnoy*. A solução *Carnoy* é composta por uma mistura de álcool etílico absoluto e ácido acético absoluto (3:1) (Figura 3.4). Este solvente tem a função de interromper o ciclo celular das raízes da cebola facilitando, posteriormente, a visualização das células no microscópio naquele instante em que foi paralisado. As raízes foram colocadas em um tubo Falcon, identificadas com a respectiva dose absorvida e, então, completamente imersas em fixador *Carnoy*. As raízes imersas no fixador ficaram reservadas por um período de 24 h em temperatura ambiente (25 ± 1) °C. Após o tempo necessário, as raízes foram retiradas do fixador *Carnoy*, transferidas para um novo tubo *Falcon*, e, então, imersas em álcool 70% a fim de conservar o estado de “congelamento” do ciclo celular. As raízes foram armazenadas na geladeira a 4 °C até o dia da produção de lâminas.

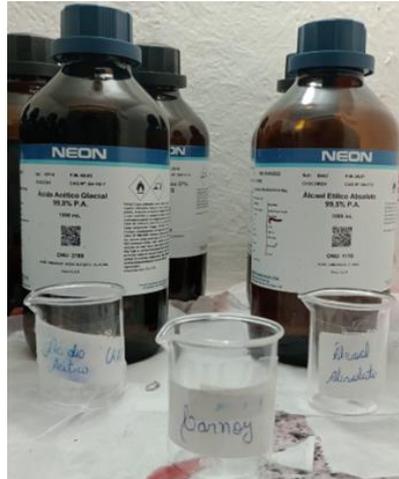


Figura 3-4 Componentes para preparação do fixador *Carnoy*: Ácido Acético Absoluto e Álcool etílico.

3.4 Produção de Lâminas

Para a produção de lâminas de microscopia, as raízes de *Allium cepa* foram submetidas a dois procedimentos principais: hidrólise e coloração. As raízes foram hidrolisadas por cinco minutos em uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1N mantida a 42 °C. Após a hidrólise, as raízes foram coradas comorceína acética 2% por um período entre 10 e 30 minutos. Aorceína é um corante que confere às células vegetais uma coloração vermelha. Para aumentar o contraste da coloração e melhorar o espalhamento das células, uma gota de ácido acético 45% foi adicionada após a coloração. O ácido acético atua como um descolorante, removendo o excesso deorceína das células. Os meristemas das raízes coradas foram separados com uma lâmina de bisturi e colocados sobre uma lâmina de vidro. Em seguida, uma lamínula foi colocada sobre as raízes e cuidadosamente pressionada para que as células se espalhassem. Para finalizar a montagem, as bordas da lamínula foram vedadas com esmalte incolor. As lâminas semipermanentes foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C para aumentar seu tempo de conservação. O armazenamento a baixas temperaturas retarda o processo de deterioração das células. O processo é ilustrado na Figura 3.5.



Figura 3-5 – Preparação das lâminas de microscopia. (A) – Processo de hidrólise das raízes em HCl. (B) – Raízes expostas a orceína. (C) – Lâminas de microscopia produzidas.

3.5 Determinação das frequências de aberrações cromossômicas (ACs), micronúcleos (MNs) e índice mitótico (IM)

Para a análise citotóxica das células de *Allium cepa*, lâminas de microscopia foram avaliadas por meio de microscópio óptico da marca *Olympus BX51* com ampliação de 1000× (Figura 3.6). A citotoxicidade das células foi estudada através da avaliação do índice mitótico (IM) calculado pela equação (3.1). No experimento com partículas beta, 1000 células por cada lâmina foram observadas e contabilizadas, totalizando 15000 células (5 lâminas × 1000 células × 3 replicatas).

$$IM = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{número total de células analisadas}} \times 100 \quad (3.1)$$

onde o número de células em divisão se refere as células em fase de prófase, metáfase, anáfase ou telófase e o número total de células analisadas refere-se às células em divisão mais as células em interfase.

Para o estudo da genotoxicidade em células de *Allium cepa*, foi levada em consideração a avaliação da frequência de células com micronúcleos (FMN%), calculada pela equação (3.2). Para a quantificação dos micronúcleos induzidos pelas irradiações com partículas beta, 15000 células foram avaliadas. Foram consideradas como critério de avaliação apenas as células com

membranas citoplasmáticas intactas e MNs com dimensão de até 1/3 do tamanho do núcleo principal da célula.

$$\text{FMN}\% = \frac{\text{número de células com MNs}}{\text{número total de células analisadas}} \times 100 \quad (3.2)$$

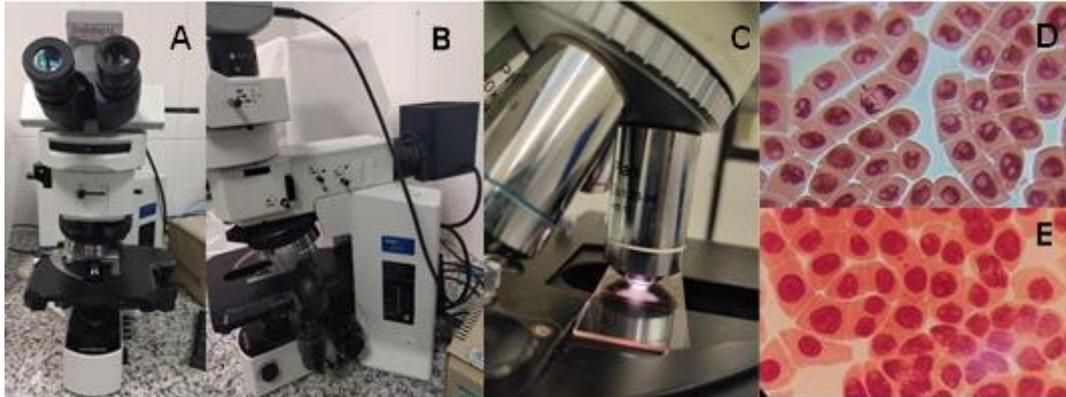


Figura 3-6 – Microscópio óptico Olympus BX51. (A) Vista frontal do microscópio; (B) Vista lateral do microscópio; (C) Lâmina sob a objetiva de 100×; (D – E) Visualização das imagens das células com o aumento de 1000× (Fonte: Xavier, 2023).

3.6 Análise estatística

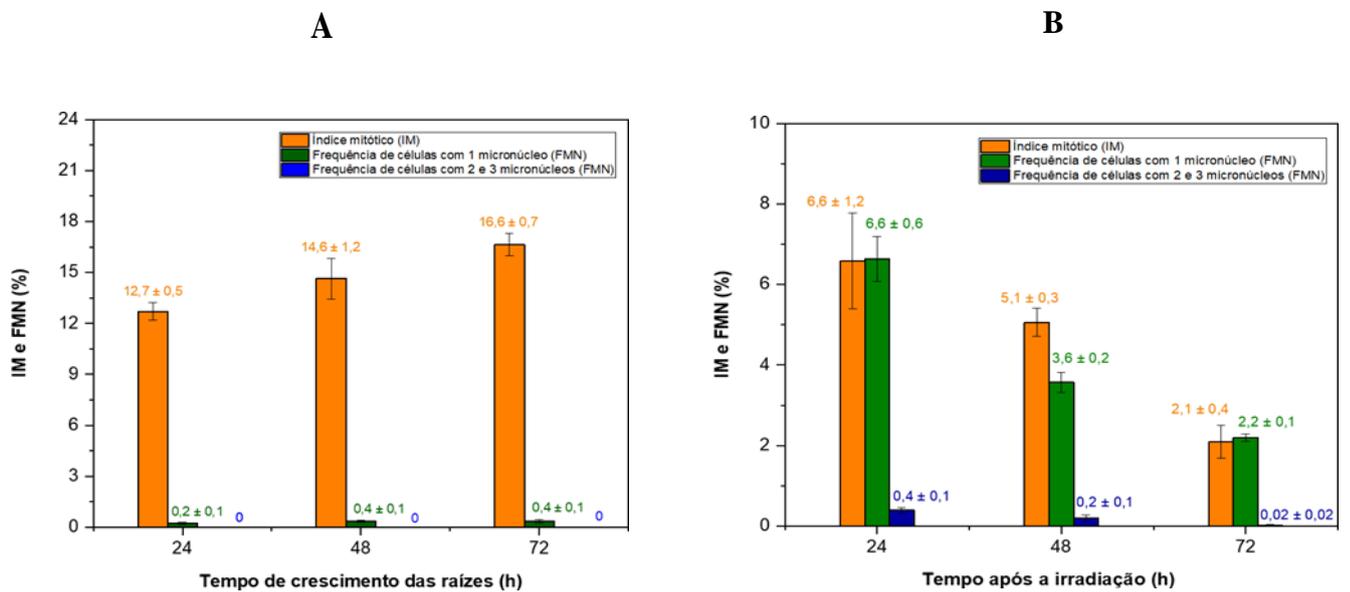
Para verificar se os dados seguiam uma distribuição normal, foram realizados testes de normalidade recomendados para cada tamanho amostral. Para os experimentos com partículas beta, com tamanho da amostra $N=15$, foi utilizado o teste de D'Agostino-Pearson ($p < 0,05$). Após a verificação da normalidade dos dados, foi realizada uma análise de variância para as médias de IM e MNs (ANOVA *one-way*), seguida do teste de *Tukey* para verificar se as diferenças entre as amostras irradiadas com diferentes doses absorvidas eram estatisticamente significativas. As análises estatísticas foram realizadas usando o software *GraphPad Prism* 9.0.2.

3.7 Investigação da resposta de MNs em função do tempo

O ciclo celular completo da *Allium cepa* tem a duração aproximada de 24 horas, representando o tempo mínimo para a detecção de células com micronúcleos (MNs) (Vaijapurkar *et al.*, 2001). No entanto, é igualmente importante compreender os potenciais mecanismos subjacentes a esses danos citogenéticos, que podem resultar em perdas de genes funcionais, segregação desigual e envelhecimento prematuro de cromossomos devido a quebras, perdas e degradação dessas estruturas durante ciclos celulares subsequentes. Para investigar esses possíveis mecanismos, uma análise do índice mitótico (IM) e da frequência de células com MNs foi conduzida em raízes de *Allium cepa* irradiadas com doses de 0,36, 0,72 e 1,44 Gy de partículas β , coletadas em intervalos de 24, 48 e 72 horas após as irradiações. Aproximadamente 5.000 células foram quantificadas para cada dose e período de tempo, incluindo os respectivos grupos de controle não irradiados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a análise dos resultados foi dividida em duas etapas. Primeiramente (Figura 4.1) foi investigado o comportamento da frequência de células com micronúcleos (FMN), simples e duplos, bem como o índice mitótico (IM) das células de *Allium cepa* irradiadas com partículas β em relação as doses absorvidas de 0,36, 0,72 e 1,44 Gy, individualmente, para os ciclos celulares de 24, 48 e 72 h. O intuito desta análise foi observar os efeitos da radiação ionizante beta nas células de *Allium cepa*, ao longo dos três primeiros ciclos pós irradiação, e como a radiação afeta a sua taxa de proliferação celular sadia, inibindo-a ou estimulando-a, nesses períodos. A segunda análise (Figura 4.2) consistiu em comparar esses parâmetros citogenéticos, ou seja, frequência de células com micronúcleos simples e múltiplos com o índice mitótico, para cada ciclo temporal individualmente, tendo como referência o aumento da dose absorvida e a sua comparação com o grupo de controle não irradiado.



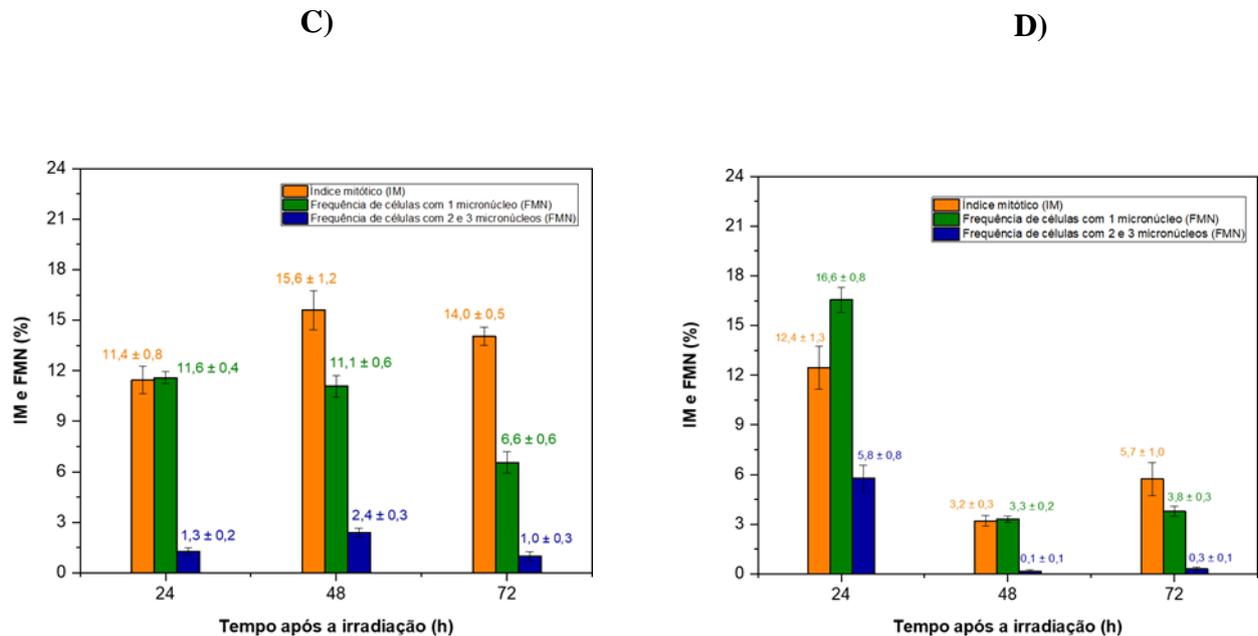


Figura 4-1 Análise gráfica da evolução temporal do IM e das frequências de células com micronúcleos simples e múltiplos (média \pm erro padrão da média) em células de *Allium cepa* irradiadas com partículas beta. A) grupo controle (não irradiadas); B) Amostras irradiadas com 360 mGy; C) Amostras irradiadas com 720 mGy; D) Amostras irradiadas com 1,44 Gy.

Em relação ao grupo de controle não irradiado, que consiste em uma amostra de raízes de *Allium cepa* que não foram expostas a radiação, pode-se observar na Figura 4.1- A um comportamento pouco variável para o índice mitótico. Estatisticamente, o IM apresentou um leve aumento, considerado significativo ($p < 0,05$) observado nos ciclos de 24 e 72 h. Não houve significância estatística no índice mitótico do ciclo de 48 h quando comparado com o índice mitótico dos ciclos de 24 e 72 h respectivamente. Analisando a frequência de células com micronúcleos simples para os três tempos estudados, foi constatado que as FMN estão dentro dos limites exigidos pela Agência Internacional de Energia Atômica de no máximo 3 MN para cada 1000 células analisadas, (IAEA, 2011). Essa informação é importante para assegurar que o grupo de controle está apto para fins de comparação com os grupos irradiados. Não foram detectadas células com 2 ou 3 MN nesse grupo controle em nenhum dos momentos analisados.

Analisando individualmente o grupo de células irradiadas com dose absorvida de 0,36 Gy, Figura 4.1- B, foi observado através dos testes estatísticos que não houve significância estatística do IM quando comparado o primeiro e o segundo ciclos celulares (24 e 48 h) pós irradiação. Mas, quando comparados o segundo e o terceiro ciclos (48 e 72 h), foi detectada uma redução com significância ($\rho < 0,05$) no IM das células de *Allium cepa*. Essa diferença estatística também foi observada quando comparado o ciclo de 24 h com o ciclo de 72 h. O IM se mostrou um fator importante para a detecção de MN principalmente após o segundo e terceiro ciclo celular, pois ambos obtiveram uma relação diretamente proporcional. Ou seja, conforme o IM apresentava uma diminuição, também era observado uma redução proporcional da FMN simples.

Em termos quantitativos, Figura 4.1- B, a frequência de células com MN simples com 0,36 Gy para o ciclo de 24 h após a irradiação apresentou o valor de $(6,6 \pm 0,6) \%$. Para o ciclo de 48 h após a exposição, obteve-se o valor de $(3,6 \pm 0,2) \%$. E, finalmente, para o ciclo de 72 h pós exposição à radiação, o resultado da análise foi de $(2,2 \pm 0,1) \%$. MN múltiplos foram detectados nos ciclos de 24 e 48 h após irradiação, porém os mesmos não apresentaram significância estatística ($\rho > 0,05$). A partir do ciclo de 72 h, seus valores são praticamente zerados.

Os efeitos da segunda dose analisada, de 0,72 Gy, estão na Figura 4.1- C. Fazendo a análise estatística dos dados, foi observado que o IM das células de *Allium cepa* sofreu um aumento estatisticamente significativo ($\rho < 0,05$) entre os ciclos de 24 e 48 h pós irradiações. Entretanto, para o ciclo de 72 h o índice mitótico apresenta uma leve queda, mas sem significância estatística. Quando foi analisada a frequência de células com micronúcleos simples para esta dose, não foi observada diferença estatística para os ciclos de 24 e 48 h pós irradiações. Porém, quando observado o ciclo de 72 h, foi constatado uma queda brusca dessa frequência de MN, apresentando, então, significância estatística ($\rho < 0,05$). Avaliando a FMN múltiplos, pode-se observar um aumento significativo de aproximadamente 1% no ciclo de 48 h quando comparada com o ciclo de 24 h. Contudo, quando observado o ciclo de 72 h, a FMN voltou a ficar de mesmo valor do ciclo de 24 h.

Para a maior dose absorvida investigada, 1,44 Gy, Figura 4.1- D, destaca-se a influência do IM para a detecção de células com micronúcleos. Quando comparados os ciclos de 24 e 48 h é perceptível uma queda brusca e significativa ($\rho < 0,05$) do IM ao final do segundo ciclo pós irradiação. Quando observado o ciclo de 72 h é notado que o IM apresentou um leve aumento quando comparado com o ciclo de 48 h, mas sem diferença estatística. Essa significância estatística ($\rho < 0,05$) foi constatada apenas quando comparado o ciclo de 72 h com o ciclo de

24 h. As frequências de células que continham MNs simples apresentaram uma dependência do IM, visto que foi detectada uma diminuição abrupta e com significância estatística ($p < 0,05$) de aproximadamente 80% na frequência de micronúcleos simples da amostra com ciclo de 48 h pós irradiação em comparação com a FMN simples da amostra com ciclo de 24 h pós irradiação. Quando observado o ciclo de 72 h foi constatado que o valor da FMN simples permaneceu aproximadamente inalterado. Para a FMN múltiplos foi notado que no ciclo de 24 h pós irradiação obteve cerca de 1/3 da FMN simples detectada. Em contrapartida, quando observados os dois ciclos posteriores (48 h e 72 h), foi observado que seus valores foram praticamente zerados. Ou seja, quando os ciclos se sucedem, os danos mais graves vão diminuindo porque provavelmente os mecanismos de reparo do DNA não são efetivos para lidarem com esse nível de dano, as células danificadas ou mais provavelmente as células mais danificadas não conseguem se multiplicar e morrem. Assim, nos ciclos subsequentes a frequência observada desses danos é menor.

Para a segunda parte da análise, a Figura 4.2 mostra graficamente uma comparação entre o IM e as frequências de MN simples e múltiplos em relação ao aumento da dose absorvida de partículas β e suas evoluções temporais em ciclos de 24, 48 e 72 h pós irradiações. Todas as comparações desses *endpoints* foram feitas em relação aos seus respectivos grupos de controle não irradiados.

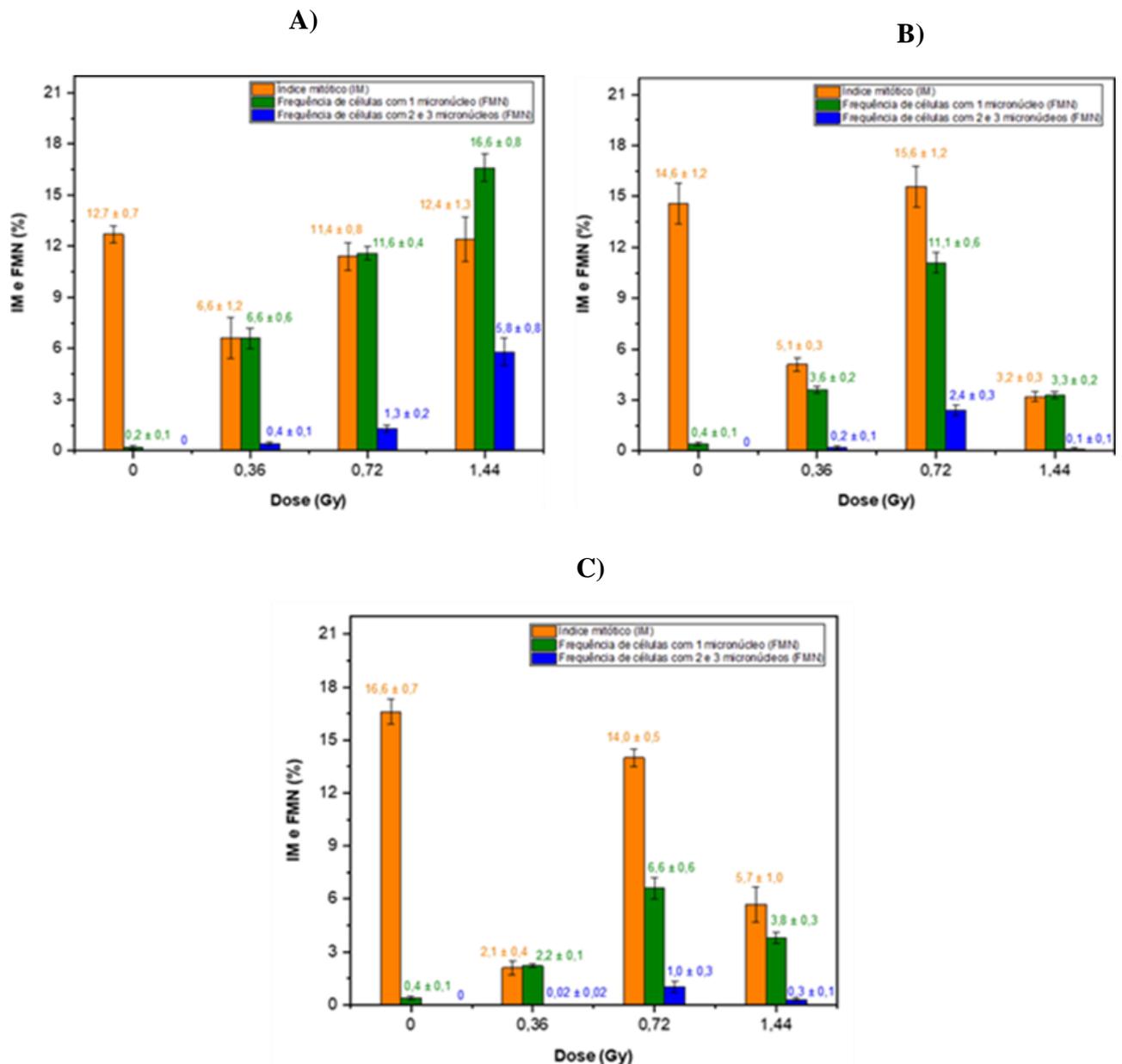


Figura 4-2 Análise gráfica da frequência de *endpoints* citogenéticos induzidos em células radiculares de *Allium cepa* por exposições a partículas β em A) 24 h, B) 48 h e C) 72 h pós irradiações (média \pm erro padrão da média).

No primeiro cenário, Figura 4-2-A, temos o comportamento dos *endpoints* induzidos por partículas β e seu respectivo grupo de controle não irradiado para o primeiro ciclo celular das células de *Allium cepa*, ou seja, as primeiras 24 h pós irradiação. Quando comparado o grupo de células irradiadas com a dose absorvida de 0,36 Gy com o grupo de células não irradiadas, observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 50% do seu IM. Para as doses posteriores, 0,72 e 1,44 Gy, os índices mitóticos voltam a crescer e se aproximam do valor do IM do grupo de controle não irradiado. Uma possível explicação para

essa redução do IM da amostra irradiada com dose absorvida de 0,36 Gy seria o ativamento dos mecanismos de defesa da célula para lidarem com esses danos citogenéticos causados pela exposição a partículas β (IAEA, 2011).

Em relação a FMN simples e múltiplos, foi observado que a amostra irradiada com 0,36 Gy obteve o menor percentual dentre as amostras irradiadas, o que pode afirmar a hipótese do ativamento dos mecanismos de defesa. Para as doses de 0,72 e 1,44 Gy, a FMN simples cresceu na mesma proporção que seus respectivos IM. Esse fato pode indicar uma incapacidade das células em ativar seus mecanismos de defesa e lidarem com os danos em doses maiores, a partir de 0,72 Gy (Xavier, 2023). Essa informação pode ser confirmada quando observado o aumento significativo ($p < 0,05$) da FMN múltiplos para as doses de 0,72 e 1,44 Gy, indicando um aumento na gravidade desses danos logo no primeiro ciclo celular das células de *Allium cepa* (George *et al.*, 2014; Bolsunovsky *et al.*, 2019).

No cenário para o ciclo de 48 h pós irradiações, Figura 4-2-B, observa-se que, para a dose absorvida de 0,36 Gy, houve uma redução do IM com significância estatística ($p < 0,05$) em cerca de 2/3 em relação ao controle não irradiado. Posteriormente, na dose de 0,72 Gy, o IM volta a crescer e se aproximar do valor do IM da amostra de controle não irradiada. Este comportamento muda quando observada a amostra irradiada com 1,44 Gy, na qual o IM teve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 4/5 do valor do IM da amostra de controle não irradiada.

Para este ciclo de 48 h, é notória a influência do IM para o aumento ou redução da FMN. Na amostra irradiada com 0,36 Gy é observada a redução da FMN acompanhada da redução do seu IM. Enquanto que para a dose de 0,72 Gy, a FMN aumenta na medida que seu IM aumenta. Por fim, com a dose de 1,44 Gy, a FMN voltou a diminuir bem como seu IM. Vale ressaltar que mesmo com o aumento ou diminuição da FMN para as 3 doses investigadas, em todo o intervalo de dose, a frequência de MN se manteve maior do que a FMN do grupo de controle não irradiado.

Por fim, para o maior tempo (72 h) pós irradiações, mostrado na Figura 4-2-C, quando investigada a dose de 0,36 Gy, foi observado que seu IM foi o menor dentre todas as amostras irradiadas. Esse fato pode indicar uma atividade citotóxica para esta dose. Já para a dose de 0,72 Gy é observado um aumento do IM, se aproximando do valor do IM da amostra não irradiada. Isso pode ser um indicativo de adaptação das células de *Allium cepa* para essa dose absorvida de 0,72 Gy. Quando as plantas são repetidamente expostas à radiação ionizante, seja em cenários agudos ou crônicos, têm a capacidade de desenvolver respostas adaptativas que melhoram a sua capacidade de resistir à radiação. Estas respostas adaptativas podem abranger

alterações na expressão genética, vias metabólicas e processos fisiológicos, aumentando em última análise a sua resistência ao stress induzido pela exposição à radiação (Ludovici *et al.* 2020). Para a dose de 1,44 Gy, foi observado que, apesar do seu IM ter apresentado um aumento no ciclo de 72 h em comparação ao IM do ciclo de 48 h pós exposição à radiação, ainda sim seu crescimento foi cerca de 2/3 menor que o IM da amostra não irradiada de 72 h.

A análise da frequência de células com micronúcleos simples para a dose de 0,36 Gy no ciclo de 72 h pós irradiação, reforça a indução de atividade citotóxica nas células de *Allium cepa* para esta dose. Quando analisado a frequência de células com micronúcleos para a dose 0,72 Gy, é observado que os valores também sustentam a hipótese do IM em de que há uma maior capacidade das células em ativar seus mecanismos de defesa para lidar com danos induzidos para essa dose (Xavier, 2023). Esse fato é mais bem apresentado quando observada a redução do valor da frequência de células com micronúcleos em cerca de 50% em comparação ao ciclo de 48 h pós irradiação.

Por último, para a dose de 1,44 Gy, foi observado que, apesar do IM ter dado sinais de recuperação quando comparado com o IM do ciclo de 48 h, o valor da FMN simples permaneceu praticamente o mesmo, o que sugere uma possível instabilidade cromossômica (Xavier, 2023). Para a FMN múltiplos foi constatado diferença estatística ($p < 0,05$) para a dose de 720 mGy quando comparado ao controle não irradiado. É importante ressaltar que para o ciclo de 72 h pós irradiações, a frequência de células com MN simples para todas as amostras irradiadas permaneceu superiores que a FMN simples para a amostra não irradiada.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo investigou os efeitos da radiação β sobre o índice mitótico e a frequência de células com micronúcleos simples e múltiplos em células de *Allium cepa*. O foco principal foi a análise temporal da evolução desses *endpoints* em doses absorvidas de 0,36, 0,72 e 1,44 Gy. A partir disso, foi observada possível inferir que o IM influencia fortemente células com MNs simples e múltiplos. Foi possível observar que, quando consideradas as doses absorvidas de 0,36 e 1,44 Gy, a primeira induziu uma diminuição gradual do IM ao longo dos três ciclos celulares estudados. Em contrapartida, para a maior dose, não foi detectado essa redução no primeiro ciclo celular, apenas no segundo e terceiro ciclo, com reduções de 3/4 e 2/3, respectivamente, quando comparado com o IM detectado após o término do primeiro ciclo celular pós irradiação. Conclui-se então, que as raízes de *Allium cepa* podem apresentar uma tentativa de recuperação dos danos, com possível adaptação às doses mais elevadas, ainda que apresente instabilidade cromossômica em todos os valores de dose absorvida investigados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATTIX, F. H. *Introduction to radiological physics and radiation dosimetry*. Germany: Wiley-Vch, 1986.
- BITELLI, T. Física e dosimetria das radiações. 2ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu; Centro Universitário São Camilo. 2006. 422 p. ISBN: 978-8-575-59091-1.
- BOLSUNOVSKY, A.; DEMENTYEV, D.; TROFIMOVA, E.; INIATKINA, E.; KLADKO, Y.; PETRICHENKOV, M. Chromosomal aberrations and micronuclei induced in onion (*Allium cepa*) by gamma-radiation. *Journal of Environmental Radioactivity*. v. 207, p. 1 – 6, 2019.
- BOWLER, D., MOORE, S., MACDONALD, D., SMYTH, S., CLAPHAM, P., KADHIM, M. Instabilidade genômica mediada por Bystander após alta radiação LET em células-tronco hemopoiéticas primárias murinas. *Mutante. Res.* 597, 50-61 (2006)
- BRÜCKMANN, M. E. Radioatividade. Porto Alegre: Instituto de Física – UFRGS, 1991. 39p.
- BUSHBERG, J. T. *The essential physics of medical imaging*, 2010 — 3rd ed. 1043p. ISBN 978-0-7817-8057-5.
- BUSHONG, S. C. Ciência radiológica para tecnólogos: física, biologia e proteção. [tradução Sandro Martins Dolghi *et al.*]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- CARVALHO, M. B.; RAMIRES, A.; GATTÁS, G. J. F.; GUEDES, A. L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; NETO, J. C. B.; CURIONI, O. A. “Correlação entre a Evolução Clínica e a Frequência de Micronúcleos em Células de Pacientes Portadores de Carcinomas Orais e Orofaringes.” *Rev Assoc Med Bras*, 2002: 317-322.
- EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. *Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody*. *Environ. Mol. Mutag.*, v. 13, p. 34-43, 1989.

FISKESJÖ, G. *The Allium test as a standard in environmental monitoring*. Hereditas, 102: 99-112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>, 1985.

FRAGOSO, L. R.; BALTASAR, E. H.; ESPARZA, J. A. R. *El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer*. Biotecnología aplicada, 2006. 21(2), 60-69.

GEORGE, J. T.; PATEL, B. B.; RANE, V. A.; VENU-BABU, P.; EAPEN, S.; SINGHAL, R. K.; PIUS, J.; NARULA, B.; SHANKHADARWAR, S. *Non-linear dose response of a few plant taxa to acute gamma radiation*. Cytologia. v. 79, n. 1, p. 103 – 109, 2014.

HIGLEY, K. A. Integração da proteção radiológica do meio ambiente no sistema de proteção radiológica. Annals ICRP 47(3–4), 270–284 (2018).

IAEA - *International Atomic Energy Agency*, Technical Report Series. Biological dosimetry chromosomal aberration analysis for dose assessment. Technical Report Series n 260, Vienna, IAEA, 1986 STI/PUB/10/260.

IAEA - *International Atomic Energy Agency*, Technical Report Series. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA, 2011.

KNOBLICH, J. A. 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. Cell 132:583-597.

L' ANNUNZIATA, M. F. *Radioactivity: Introduction and History*. 1ª. ed. aum. Amsterdam: Elsevier, 2007. 633 p. ISBN 978-0-444-52715-8.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. *Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of Allium cepa root cells*, Aquat. Toxicol. 88 (2008) 214–219.

LOMATO, L.D.; CALA, O.L.O.; BRETÓN, C.O.P.; LIZCANO, A.I.G.; COMEJO, V.M.M. El ciclo celular. MED UNAB. v. 6, p. 16, 2003.

LUDOVICI, G.M.; CASCONI, M. G.; HUBER, T.; CHIERICI, A.; GAUDIO, P.; DE SOUZA, S.O.; D'ERRICO, F.; MALIZIA, A. Cytogenetic bio-dosimetry techniques in the detection of dicentric chromosomes induced by ionizing radiation: A review. *European Physical Journal Plus* v. 136, p. 482 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jenrad.2020.106375>

MOREIRA, C. Mitose, *Rev. Ciência Elementar*, V3(3):170. DOI: <http://doi.org/10.24927/rce2015.170>. (2015)

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. *SciELO*. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100014>, (2013).

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. Física das radiações. São Paulo: Oficina de textos, 2010.

PODGORSKAK, E. B. *Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students*. Ed. IAEA. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2005.

SÁ JR, A. R. M.; CARDOSO R. P; MUNIZ, M. C.; CID, A. S.; LACERDA, T. C. Interação da Física das Radiações com o Cotidiano: uma prática multidisciplinar para o Ensino de Física. *Revista Brasileira Ensino Física* [Internet]. 2017;39(1). Available from: <https://doi.org/10.1590/1806-9126-RBEF-2016-0119>

SOMMER S.; BURACZEWSKA I.; KRUSZEWSKI M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 24;21(4):1534. Doi: 10.3390/ijms21041534. PMID: 32102335; PMCID: PMC7073234.

SOUZA, S. O.; CARDOSO JÚNIOR, A. A.; SARMENTO, A. S. C.; d'ERRICO, F. Effectiveness of a UVC air disinfection system for the HVAC of an ICU. *The European Physical Journal Plus*. v. 137, p. 37, 2022.

SOUZA, S. O.; PRAZERES, C. L. S.; VIEIRA, J. S.; ALMEIDA, W.; SARMENTO, A. S. A. C.; DA CRUZ, P. V. D.; RODRIGUES JUNIOR, J. J.; OLIVEIRA, E.N.; ATTIE, M.R.P.; DA SILVA JÚNIOR, W. M. *UVC cabin development for N95 medical masks disinfection*, *Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação COVID* 197(2), 17–30 (2020).

TAUHATA, L.; SALATI I. P. A.; PRINZIO, R.; PRINZIO, M. A. R. R. Radioproteção e Dosimetria: fundamentos. Rio de Janeiro: IRD/CNEN (2003).

TANG, F. R.; LOGANOVSKY, K. Low dose or low dose rate ionizing radiation-induced health effect in the human. *Journal of Environmental Radioactivity*. v. 192, p. 32 – 47, 2018.

TUCKER, M. R.; LAUX, T. 2007. Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends in Cell Biology* 17:403-410.

UCHÔA, I. S.; MAGALHÃES, M. A. Teste de micronúcleo um importante biomarcador celular. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 61601-61606, 2020.

VAIJAPURKAR, S. G.; AGARWAL, D.; CHAUDHURI, S. K.; SENWAR, K. R.; BHATNAGAR, P. K. Gamma-irradiated onions as a biological indicator of radiation dose. *Radiation Measurements*. v. 33, n. 5, p. 833 – 836, 2001.

WALPOLE, R. E.; MYERS, R. H.; MYERS, S. L.; YE, K. Introdução à Estatística. 3ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

XAVIER, M. N. Avaliação de danos radioinduzidos devido à exposição aos radionuclídeos ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K através de sistemas bioindicadores. 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2018.

XAVIER, M. N.; PANTALEÃO, S. M.; SCHER, R.; CIOLINI, R.; D'ERRICO, F.; SOUZA, S. O. Allium cepa used as a dosimetry system in nuclear and radiological emergencies. *The European Physical Journal Plus*, v. 136, n. 6, p. 682, (2021).

XAVIER, M. N.; NOVAES, J. A. T.; SILVA, A. C. C.; ALVES, A. V. S.; SANTOS, M. J. B. A.; PANTALEÃO, S. M.; SCHER, R.; D'ERRICO, F.; SOUZA, S. O. Cytogenetic effects of beta-particles in Allium cepa cells used as a biological indicator for radiation damages. *Journal of Environmental Radioactivity*, v. 259-260, p. 107-109 (2023).

XAVIER, M. N. Viabilidade do uso de biota vegetal para caracterização biofísica e análise dosimétrica de danos citogenéticos induzidos por radiação ionizante. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2023. 118 p. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Federal de Sergipe, 2023.

YOSHIMURA, E. M. Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. Revista Brasileira de Física Médica, v. 3, n. 1, p. 57–67, 2009.

YOUNG, H. D.; FREEDMAN, R. Física Nuclear: Decaimento Beta. In: YOUNG, Hugh D; FREEDMAN, Roger. Física IV: Ótica e física moderna. 12. ed., 2009. cap. 43, p. 337-338.