



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – POSGRAP

NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA – NPGFI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação de danos radioinduzidos devido à exposição aos radionuclídeos ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K através de sistemas bioindicadores

por

MAGNO NOGUEIRA XAVIER

São Cristóvão – SE
Julho de 2018

MAGNO NOGUEIRA XAVIER

Avaliação de danos radioinduzidos devido à exposição aos radionuclídeos ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K através de sistemas bioindicadores

Dissertação de Mestrado apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Física.

Orientadora: Profa. Dra. Susana de Souza Lalic

São Cristóvão – SE
Julho de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Núcleo de Pós-Graduação em Física

“Avaliação de danos radioinduzidos devido à exposição aos radionuclídeos ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K através de sistemas bioindicadores”

por

Magno Nogueira Xavier

Dissertação de mestrado **APROVADA** em sessão pública no dia vinte de julho do ano dois mil e dezoito perante a banca examinadora constituída pelos seguintes professores:



Profa. Dra. Susana de Souza Lalic
(DFI-UFS)



Profa. Dra. Ana Figueiredo Maia
(DFI-UFS)



Prof. Dr. Guilherme Soares Zahn
(IPEN-SP)

Agradecimentos

A Deus.

À Profa. Dra. Susana Lalic, pelos ensinamentos, pela confiança em mim depositada, pela paciência, compreensão e pelo respeito que sempre demonstra pelos seus orientandos.

À Profa. Dra. Simara Campos, por ter incentivado a minha curiosidade científica no período que fui seu orientando de IC, além da amizade conquistada.

Ao Prof. Dr. Shigueo Watanabe, pela colaboração com essa pesquisa, liberando o Laboratório de Cristais Iônicos, Filmes finos e Datação (LACIFID) do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IF-USP) para realização de medidas.

À Dra. Roseli Gennari, que nos ajudou com as medidas de FT-IR e esclarecimentos sobre a técnica, além de sua enorme hospitalidade e acolhimento no LACIFID.

A todos do Laboratório de Arqueometria do IF-USP.

À Dra. Linda Caldas, pela parceria com o nosso grupo de pesquisa e atenção dispensada.

À equipe do Laboratório de Radiometria Ambiental do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), sobretudo, ao Dr. Marcelo Máduar, pela realização das medidas de espectrometria gama e a sua disponibilidade para esclarecimentos.

À Profa. Dra. Eliane Maffei, pela sua colaboração com a técnica de micronúcleos.

Aos amigos do mestrado, em especial, Bárbara Matos, Caroline Castro, Débora Siqueira e Rennan Rocha, pelos momentos de estudo e descontração, que tornaram esse período de 2 anos mais ameno.

Aos professores da Pós-Graduação, por direcionarem os meus estudos nas disciplinas cursadas.

Aos meus pais, irmã e sobrinha, que mesmo de longe sempre me deram/dão apoio, sendo eles a minha base e maior motivação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram até o momento, direta ou indiretamente, para a minha formação acadêmica e pessoal.

RESUMO

XAVIER, M. N. **Avaliação de danos radioinduzidos devido à exposição aos radionuclídeos ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K através de sistemas bioindicadores.** São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2018. 98 p. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

A incorporação frequente de radionuclídeos através de ingestão de água e/ou alimentos é capaz de elevar os níveis de radiação dentro do corpo acima do limite tolerável. Assim, alimentos cultivados em solos de alto *background* radioativo, como por exemplo, no entorno de minas de urânio, podem ser potenciais agentes de risco. O consumo desses produtos tem a possibilidade de induzir danos que, quando acumulados, podem evoluir para uma carcinogênese. Neste trabalho, buscou-se avaliar o potencial de baixas concentrações de radionuclídeos promoverem mutações radioinduzidas. Foi dado ênfase aos radionuclídeos ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K , pois essas espécies são as que mais contribuem para o aumento dos níveis de exposição à radioatividade natural. Pela primeira vez foram utilizados bioindicadores vegetais expostos à diferentes concentrações de estéril de urânio (0,25 g, 0,50 g, 0,75 g e 1,00 g). Foram usadas sementes de alface (*Lactuca sativa*) e sementes de cebola (*Allium cepa*), cultivadas em placa de Petri por 3 e 7 dias, respectivamente, na presença de estéril de urânio. Esse é o tempo intrínseco para germinação de cada uma dessas plantas e conseqüentemente, o período em que as suas células ficaram expostas ao *background* radioativo, enquanto os seus tecidos (raízes) se desenvolviam. As células de cebola são consideradas como um bioindicador universal pois reportam uma concordância de 71% a 91,5% com os testes realizados com células de mamíferos, além de conservarem uma boa concordância com os efeitos observados em células de sangue periférico humano. As atividades dos radionuclídeos investigados foram obtidas por meio de espectrometria gama de alta resolução, sendo a do ^{40}K a única que foi estimada diretamente. Como o ^{238}U e o ^{232}Th são emissores alfa puros, as suas atividades foram obtidas indiretamente por meio de membros emissores de radiação gama de suas séries. Por se tratar de uma rocha, é possível fazer a consideração de que esses radionuclídeos estão imobilizados na escala geológica de tempo da amostra. Assim, ao estabelecer a condição de equilíbrio radioativo, as atividades dos filhos foram consideradas como sendo a dos respectivos progenitores das séries. Análises por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier foram feitas nas raízes de ambos os bioindicadores para detectar alterações/ degradações estruturais decorrentes da exposição à radiação ionizante e/ou de uma possível incorporação de radionuclídeos. Os danos celulares foram investigados por meio do teste de micronúcleo, técnica recomendada pela IAEA para avaliar mutação radioinduzida. Os resultados indicaram valores de atividades compatíveis com aqueles de regiões de baixos níveis de radioatividade de fundo. No entanto, para ambos os bioindicadores observou-se uma incidência de danos superior ao limite recomendado pela IAEA. Os espectros de infravermelho não indicam incorporação de urânio ou de algum outro elemento pelas plantas. Demonstrou-se que é possível verificar o efeito de baixas concentrações de radionuclídeos em induzir danos às células dessas espécies, possibilitando o uso dessas plantas como bioindicadores para análise de efeitos da radiação. Este estudo conclui que mesmo para baixas concentrações, a exposição frequente aos radionuclídeos investigados pode desencadear danos locais, cujo potencial carcinogênico pode estar associado principalmente a alta *LET* dos emissores de radiação alfa.

Palavras-chave: *Background* radioativo. Bioindicadores. Caetité. FT-IR. Impacto radiológico. Urânio.

ABSTRACT

XAVIER, M. N. **Evaluation of radioinduced damages due the exposure to the radionuclides ^{238}U , ^{232}Th and ^{40}K through bioindicators systems.** São Cristóvão: Federal University of Sergipe, 2018. 98 p. Thesis (Master's degree in Physics) – Federal University of Sergipe, 2018.

The frequent incorporation of radionuclides through ingestion of water and/or food is able to raise the levels of radiation within the body above the tolerable limit. Thus, foods grown on high radioactive background soils, such as in the vicinity of uranium mines, may be potential risk agents. The consumption of these products has the possibility to induce damages that, when accumulated, may evolve into carcinogenesis. In this work, we sought to evaluate the potential of low concentrations of radionuclides to promote radio-induced mutations. Emphasis was placed on the radionuclides ^{238}U , ^{232}Th and ^{40}K , since these species contribute most to the increase of the levels of exposure to natural radioactivity. For the first time, plant bioindicators exposed to different concentrations of sterile uranium (0,25 g, 0,50 g, 0,75 g, and 1,00 g) were used. Seeds of lettuce (*Lactuca sativa*) and seeds of onion (*Allium cepa*) were used, cultivated in Petri dish for 3 and 7 days, respectively, in the presence of sterile uranium. This is the intrinsic time for germination for each of these plants and consequently, the period which its cells were exposed to the background radioactive while its tissues (roots) developed. Onion cells are considered as a universal bioindicator since they report a concordance of 71% to 91.5% with the tests performed with mammalian cells, besides maintaining a good agreement with the observed effects in human peripheral blood cells. The activities of the investigated radionuclides were obtained by means of high resolution gamma spectrometry, the ^{40}K being the only one that was directly estimated. Since the ^{238}U and ^{232}Th are pure alpha emitters, their activities were indirectly obtained by emitting gamma radiation members of their series. Because it is a rock, it is possible to consider that these radionuclides are immobilized in the geological time scale of the sample. Thus, when establishing the condition of radioactive equilibrium, it was considered that the activities of the daughters were those of the respective progenitors of the series. Fourier Transform Infrared Spectroscopy analyzes were performed on the roots of both bioindicators to detect structural changes/degradations due to exposure to ionizing radiation or a possible incorporation of radionuclides. Cell damages were evaluated by means of the micronucleus test, a technique recommended by IAEA for the evaluation of radioinduced mutation. The results indicated activity values compatible with those from regions with low levels of background radioactivity. However, for both bioindicators, an incidence of damage greater than the limit recommended by the IAEA was observed. Infrared spectra do not indicate incorporation of uranium or some other element by plants. It has been demonstrated that it is possible to verify the effect of low concentrations of radionuclides in inducing damages to the cells of these species, making possible the use of these plants as bioindicators for the analysis of radiation effects. This study concludes that even at low concentrations, frequent exposure to investigated radionuclides may trigger local damage, whose carcinogenic potential may be associated mainly with the high LET of the alpha radiation emitters.

Key words: Radioactive Background. Bioindicators. Caetité. FT-IR. Radiological impact. Uranium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Localização da província uranífera de Lagoa Real.....	14
Figura 2.1 – Esquema da série de decaimento do ^{238}U . Os símbolos α e β e o tempo mostrado indicam o tipo de radiação emitida e as meias-vidas dos emissores, respectivamente	28
Figura 2.2 – Esquema da série de decaimento do ^{235}U . Os símbolos α e β e o tempo mostrado indicam o tipo de radiação emitida e as meias-vidas dos emissores, respectivamente	29
Figura 2.3 – Esquema da série de decaimento do ^{232}Th . Os símbolos α e β e o tempo mostrado indicam o tipo de radiação emitida e as meias-vidas dos emissores, respectivamente	30
Figura 2.4 – Ionizações/excitações produzidas por radiação beta (a) e alfa (b) na molécula de DNA	37
Figura 2.5 – Esquema da estrutura de dupla hélice do DNA	39
Figura 2.6 – Esquema dos principais danos induzidos por radiação à molécula de DNA	41
Figura 2.7 – Esquema da formação de micronúcleos.....	44
Figura 2.8 – Diagramas típicos de células vegetal e animal, respectivamente.....	44
Figura 2.9 – Obtenção de espectros em FT-IR.....	47
Figura 2.10 – Sistema do espectrômetro gama e as principais partes de funcionamento do equipamento	49
Figura 3.1 – Diagrama do procedimento desenvolvido para aquisição de dados	51
Figura 3.2 – Esterilização por UV-C do sistema utilizado para cultivo dos bioindicadores...	52
Figura 3.3 – Procedimento para o cultivo dos bioindicadores	54
Figura 3.4 – Amostra de estéril de urânio cedida pela INB	55
Figura 3.5 – Frasco de polietileno (F100) com a amostra (à esquerda) e detector de HPGe (à direita)	57
Figura 3.6 – Espectrômetro de FT-IR	58
Figura 4.1 – Compostos químicos que ocorrem na alface: (1) α -lactucicol (taraxasterol); (2) β -lactucicol (lactucon, lactucerin); (3) lactucina; (4) lactucopirina.....	63
Figura 4.2 – Comparativo do espectro de FT-IR do ensaio <i>in natura</i> de alface com os demais ensaios	64
Figura 4.3 – Espectros de FT-IR dos ensaios E1, E3, E4, E5 e E6 com alface submetidos às concentrações de 0,00 g; 0,25 g; 0,50 g; 0,75g e 1,00 g de estéril de urânio, respectivamente	65

Figura 4.4 – Compostos químicos que acontecem na cebola: (1) 1-propenil-L-cisteína sulfóxido, (2) ácido 1 – propenilsulfênico, (3) óxido de tiopropionaldeído e (4) ácido sulfúrico	69
Figura 4.5 – Comparativo do espectro de FT-IR do ensaio <i>in natura</i> de cebola com os demais ensaios	70
Figura 4.6 – Espectros de FT-IR dos ensaios E1, E3, E4, E5 e E6 com cebola submetidos às concentrações de 0,00 g, 0,25 g, 0,50 g, 0,75g e 1,00 g de estéril de urânio, respectivamente	71
Figura 4.7 – Procedimento para avaliação de micronúcleos radioinduzidos nas células dos bioindicadores – (1) Sementes postas para germinar, (2) Crescimento de raízes, (3) Coleta das raízes, (4) Confecção de lâminas p/ microscopia óptica, (5) Contagem de células saudáveis e com micronúcleos.....	74
Figura 4.8 – Média de células com micronúcleos nos ensaios com alface (<i>Lactuca sativa</i>) ..	77
Figura 4.9 – Média de células com micronúcleos nos ensaios com cebola (<i>Allium cepa</i>).....	82
Figura 4.10 – Média de células com micronúcleos por ensaio de ambos os bioindicadores ..	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Algumas grandezas usadas em Física das radiações	27
Tabela 2.2 – Interação das radiações ionizantes com o ar e tecido humano	34
Tabela 2.3 – Valores de fator de peso W_R para diferentes tipos de radiação	37
Tabela 2.4 – Evolução temporal e ação das radiações no tecido biológico.....	42
Tabela 3.1 – Principais energias dos emissores gama analisados	56
Tabela 4.1 – Concentração de atividade por radionuclídeo.....	61
Tabela 4.2 – Estimativa da atividade por radionuclídeo para as concentrações de estéril de urânio utilizadas nos ensaios	63
Tabela 4.3 – Bandas associadas ao composto de UO_2	68
Tabela 4.4 – Influência da variação do <i>background</i> radioativo na frequência de micronúcleos (MN) induzidos em células de alface (<i>Lactuca sativa</i>) como bioindicador	75
Tabela 4.5 – Influência da variação do <i>background</i> radioativo na frequência de micronúcleos (MN) induzidos em células de cebola (<i>Allium cepa</i>) como bioindicador	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	OBJETIVO GERAL	19
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	20
2.1	RADIOATIVIDADE NATURAL	20
2.2	RADIAÇÕES NUCLEARES	22
2.3	GRANDEZAS E UNIDADES DE RADIAÇÃO	25
2.4	SÉRIES RADIOATIVAS NATURAIS.....	27
2.5	INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA	31
2.5.1	INTERAÇÃO COM FÓTONS	32
2.5.2	INTERAÇÃO COM PARTÍCULAS CARREGADAS	33
2.5.3	DEPOSIÇÃO MACROSCÓPICA DE ENERGIA – DOSE E <i>LET</i>	35
2.6	RADIOBIOLOGIA	38
2.6.1	MICRONÚCLEOS NA AVALIAÇÃO DE DANOS CELULARES RADIOINDUZIDOS.....	43
2.7	INSTRUMENTAÇÃO	45
2.7.1	ESPECTRÔMETRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	45
2.7.2	ESPECTRÔMETRO GAMA	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO CENÁRIO DE ESTUDO	51
3.2	PROCEDIMENTO E EQUIPAMENTO DE ESPECTROMETRIA GAMA.....	55
3.3	PROCEDIMENTO E EQUIPAMENTO DE FT-IR	58
3.4	INSTRUMENTAÇÃO PARA A CONTAGEM DE MICRONÚCLEOS	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE POR RADIONUCLÍDEO PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ESTÉRIL DE URÂNIO EMPREGADAS NOS ENSAIOS	60
4.2	ESPECTROS DE FT-IR.....	63
4.3	MICRONÚCLEOS RADIOINDUZIDOS	73

4.3.1	INFLUÊNCIA DO <i>background</i> RADIOATIVO NAS AMOSTRAS DE ALFACE	77
4.3.2	INFLUÊNCIA DO <i>background</i> RADIOATIVO NAS AMOSTRAS DE CEBOLA.....	82
4.3.3	AVALIAÇÃO DA RADIOSSENSIBILIDADE DOS BIOINDICADORES	86
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	89
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

Dependendo dos níveis de exposição, a radioatividade natural pode induzir danos à saúde do homem e, por essa razão, se justificam as rigorosas normas adotadas para minimizar eficientemente os riscos. É sabido que todos os dias recebemos pequenas doses de radiação por meio de nossa dieta, provenientes de radionuclídeos incorporados através da ingestão de água e/ou de alimentos. Recentemente, a IAEA (acrônimo de *International Atomic Energy Agency*) demonstrou interesse em aprimorar os conhecimentos sobre os níveis de radionuclídeos nesses itens, sobretudo, em circunstâncias em que podem haver elevação de seus teores (IAEA, 2017).

Tão importante quanto é mensurar a radioatividade presente em alimentos é conhecer os seus efeitos no tecido biológico após incorporados, já que essa rota de destino pode ser bastante comum. Quando células vivas são constantemente expostas à radiação podem ser destruídas ou alteradas, podendo gerar mutações e evoluir para doenças. Isso, por sua vez, varia conforme a intensidade, o tempo de exposição, o tipo de radionuclídeo, entre outros parâmetros. A junção desses dados, associadas às taxas de consumo dos referidos itens, permitem estimar a exposição do homem à radioatividade e, conseqüentemente, propor linhas de atuação em função dos resultados obtidos.

Geralmente, a presença de espécies radioativas em alimentos não alcança níveis considerados perigosos. Porém, isso pode mudar quando são cultivados em solos que as concentram. Nessas situações, a migração dessas fontes para os alimentos pode ocorrer naturalmente e em maior proporção devido a uma alta disponibilidade intrínseca do solo, como sugerido nos estudos realizados por Guimarães *et al.* (2011) e Campos *et al.* (2012). Portanto, em regiões de *background* radioativo, como no entorno de minas de urânio, muitas pessoas podem ser expostas através de sua dieta, sem saber, a níveis elevados de radiação.

Atualmente, o Brasil possui a sétima maior reserva de urânio do mundo, com uma única mina de exploração ativa, situada no município de Lagoa Real, à 45 km de distância de Caetité, no Estado da Bahia (Fig. 1.1).

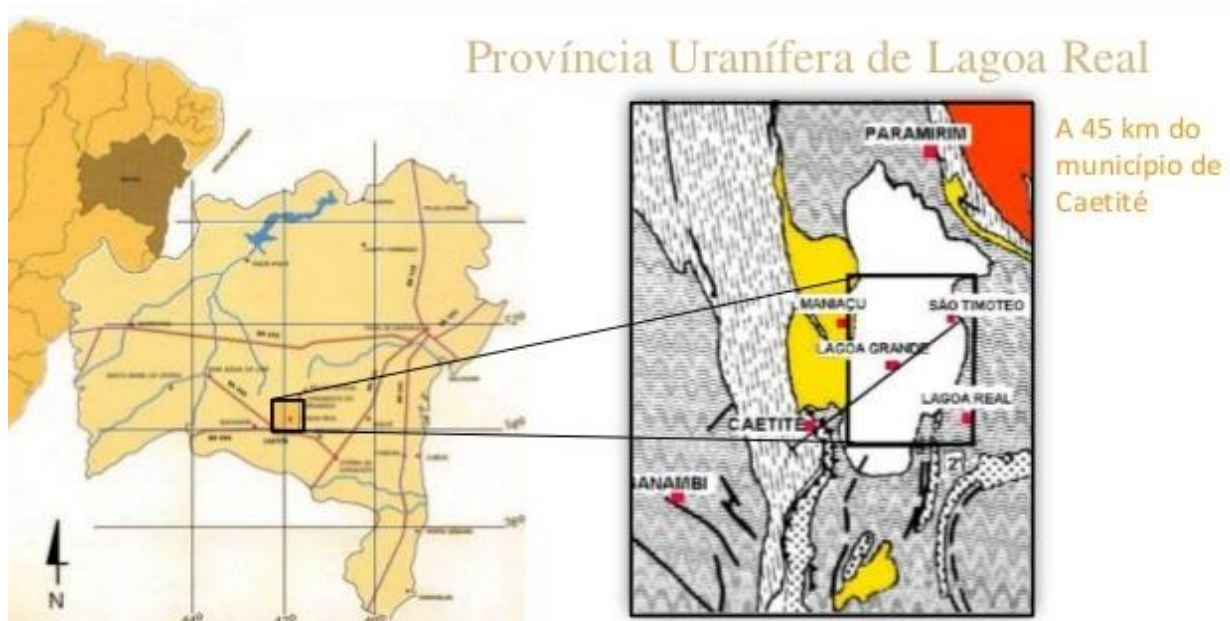


Figura 1.1 – Localização da província uranífera de Lagoa Real
(<http://pt.slideshare.net>, 2018).

Nesses municípios, a população sobrevive essencialmente de agricultura familiar e sofre com inúmeras controvérsias. São diversas especulações e assuntos não esclarecidos, os mais frequentes são o de contaminação causada pela exploração indevida do urânio e o de elevação de casos de câncer (GREENPEACE, 2008; ESTADÃO BRASIL, 2015). É preciso entender que para essas situações, quando há a presença de radionuclídeos na água e/ou nos alimentos cultivados, deve-se levar em conta a alta disponibilidade natural desses elementos no solo da região. Independentemente da causa, considerando-se que possa haver uma maior transferência de radionuclídeos para esses itens, o seu consumo frequente exporá órgãos e tecidos à radiação ionizante, cujos efeitos podem ser cumulativos com o decorrer do tempo e, conseqüentemente, evoluírem para lesões. Para esclarecer esses casos, o uso de bioindicadores pode ser um recurso a ser considerado.

Os bioindicadores são organismos ou sistemas bióticos que indicam de forma precoce alterações biológicas antes que se agravem. O modelo com plantas como marcadores de radiação transcende avaliações que se concentram apenas nos processos de incorporação de radionuclídeos. É fato que esse evento pode ocorrer com maior frequência e mais facilidade em

solos com alta disponibilidade, sobretudo, por muitos desses elementos possuírem propriedades físico-químicas similares aos nutrientes necessários para o crescimento da planta. Mas, além disso, as plantas ditas eucarióticas possuem mecanismos de mutação similares aos do homem. Logo, o sistema teste com plantas é considerado o mais adequado para detecção de mutagenicidade, pois permite avaliar níveis de impacto ambiental, traduzindo-os sob forma de alerta de riscos diretos e indiretos para a humanidade (EL SHAHABY *et al.*, 2003).

A maioria das análises que usam plantas como bioindicadores de radiação se concentram nos casos de exposição a altas doses e/ou para exposições externas, principalmente, durante episódios de desastres nucleares (KOVALCHUCK *et al.*, 1998; PTACEK *et al.*, 2001; MOHAMMADI *et al.*, 2006; MASOOMI *et al.*, 2006). É recente o interesse da comunidade científica pelos eventos em que os níveis de radiação são intrínsecos de uma localidade e não causados por ações antropogênicas. Isso tem sido motivado devido a essas regiões de *background* radioativo natural estarem apresentando taxas elevadas de casos de câncer em suas populações. Estudos em diferentes regiões de radioatividade natural do mundo vem concentrando esforços para desvendar se há uma relação entre os seus níveis e o desenvolvimento de neoplasias malignas (SAGHIRZADEH *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2009; MARCON *et al.*, 2017). Para tanto, vem sendo investigados além dos efeitos induzidos por exposições externas (que geralmente não oferecem risco quando desencadeados por baixas doses), os induzidos por exposições internas. Esses últimos vêm recebendo considerável atenção devido a radiação ser mais densamente ionizante a nível celular, o que pode causar danos com maior intensidade, tendo em vista que células danificadas sobreviventes podem se multiplicar e darem origem a um câncer (PODGORSK, 2005; BUSHONG, 2010; LAURENT *et al.*, 2016).

Os efeitos radiobiológicos a longo e curto prazo são consequência da interação da radiação com o material biológico, cujo alvo principal é o DNA (acrônimo de *DeoxyriboNucleic Acid*). Esclarecer os mecanismos iniciais (físicos), relacionados com a deposição de sua energia no meio celular, em nível micro e nanométrico até hoje é algo bastante complicado, principalmente quando se fala de danos induzidos por baixas doses. Um dos métodos mais utilizados para quantificar células danificadas é o teste do micronúcleo. A frequência com que essas estruturas aparecem pode vir a ser um indicativo preliminar do surgimento de um câncer.

Micronúcleos são o resultado de mutações a nível cromossômico, identificados como pequenos núcleos ao lado do núcleo celular principal, porém, sem conexão estrutural com ele. A denominação “micronúcleo” é devido a sua morfologia e composição ser similar ao núcleo

normal da célula, que após sofrer mutação, durante o processo de mitose, produz células filhas com dois núcleos, um normal e outro pequeno (micronúcleo), que é constituído de fragmentos dos cromossomos ou cromossomos inteiros que sofreram a mutação. Podem ser formados naturalmente ou por fatores ambientais, como por efeito da radiação (COUNTRYMAN, HEDDLE, 1976).

A técnica de micronúcleo, enquanto um marcador genético, avalia mutações induzidas pela exposição a algum agente e/ou substância e o seu potencial de evolução para estágios deletérios. Para análises de mutações induzidas por radiação, a IAEA recomenda contabilizar 1.000 células por indivíduo. Nesse intervalo, é considerado como eventos de ordem natural até 3% de células com micronúcleos. Para valores que excedam esse limite, existe uma tendência ao aumento da probabilidade de se desenvolver câncer ou doenças genéticas, pois esse é um método que quantifica danos não reparados (ou mal reparados) provenientes de quebras da estrutura do DNA, que podem evoluir para o estágio de lesão (EASTMOND, TUCKER, 1989; STREFFER *et al.*, 1998; IAEA, 2001).

Estudos sobre os efeitos do urânio em humanos, sobretudo, o uso do teste de micronúcleo como marcador de exposição à radiação, principalmente de partículas alfa e baixas doses, se restringe às células animais por ser algo recente. Em 2011 foi feito um levantamento da frequência de micronúcleos em mineradores de urânio ativos e aposentados há 15 – 20 anos. Na ocasião, foram consideradas células de sangue periférico, sendo detectadas frequências maiores nos mineradores em exercício, atribuídas às frequentes exposições ao radônio. Ademais, foi identificada uma significativa correlação entre a frequência de micronúcleos e a dose efetiva recebida nos últimos 12 meses (ZÖLZER *et al.*, 2011).

Em 2012, um estudo com células humanas monocíticas irradiadas com partículas α mostrou aumentos estatisticamente significativos e dependentes da dose (que foi variada de 0,27 a 2,14 Gy) na frequência de aberrações cromossômicas resultantes de danos severos no DNA (CHAUHAN *et al.*, 2012).

No Brasil, recentemente foi realizada a investigação entre as altas taxas de câncer com os níveis elevados de exposição à radioatividade natural na cidade de Lucrécia, no Estado do Rio Grande do Norte. Foram consideradas as atividades dos isótopos do U, Th, ^{40}K e Rn, sendo encontrados nas residências valores para o radônio que excedem em até seis vezes em relação ao grupo controle, além de níveis altos na água potável. Os demais radionuclídeos também apresentaram atividades altas. Os resultados indicaram influência do papel da radioatividade no efeito mutagênico observado em células de mucosa bucal, que podem explicar os altos índices de câncer relatados para a localidade (MARCON *et al.*, 2017).

Embora a literatura disponível não reporte estudos sobre danos radioinduzidos em células vegetais expostas ao urânio, há trabalhos similares com outros radionuclídeos, como por exemplo para o ^{226}Ra . No ano de 2003 foram investigados os níveis de atividade do ^{226}Ra em vegetais comestíveis cultivados nos solos do Ramsar, no Irã. Essa região é conhecida por ser uma das áreas com maiores níveis de radiação natural do mundo. A dose efetiva média devido a ingestão desses itens foi estimada em $72,3 \mu\text{Sv}/a$. Os autores apesar de terem avaliado esse valor como 12 vezes superior à média da dose efetiva resultante deste radionuclídeo devido à ingestão combinada de todos os alimentos e água potável em áreas de *backgrounds* radioativos normais (GHIASSI-NEJAD *et al.*, 2003), não realizaram análises epidemiológicas.

Em um estudo sobre o monitoramento da radiação de fundo (*background*), Saghirzadeh *et al.* (2008), analisaram os danos sobre a molécula de DNA de células de raízes de cebola (*A. cepa*) crescidas em solo com alto *background* radioativo no Irã, por meio da técnica do ensaio cometa. Esta técnica é destinada a avaliar a presença de lesões no DNA, sendo que as células com material nuclear lesionado se assemelham a um cometa devido sua morfologia, na qual o DNA perde sua integridade, e migra por força da eletroforese. A caracterização radiológica do solo se concentrou apenas no radionuclídeo ^{226}Ra . Os autores concluíram que há uma forte e significativa relação entre o dano ao DNA observado no núcleo das células das raízes de *A. cepa* com o aumento da concentração de atividade do ^{226}Ra do solo de onde foram cultivadas. No entanto, esse estudo não realizou medidas para verificar uma possível incorporação do elemento. O ^{226}Ra possui alta solubilidade, podendo ser facilmente lixiviado de amostras de solo e, consequentemente, incorporado pela estrutura bioquímica de plantas. Por isso, a avaliação de incorporação de radionuclídeos não pode ser negligenciada, uma vez que o efeito pode ser causado pela soma de mais de um fator.

Nesse contexto, como fatores intrínsecos de uma determinada localidade podem levar a um acréscimo dos níveis de exposição à radioatividade natural, buscou-se avaliar a possibilidade dos *backgrounds* decorrentes de baixas concentrações de ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K desencadear mutações radioinduzidas, detectadas através de células vegetais de alface (*Lactuca sativa*) e de cebola (*Allium cepa*) expostas a diferentes concentrações de estéril de urânio (0,25 g, 0,50 g, 0,75 g e 1,00 g). Esses radionuclídeos são os que mais contribuem para a elevação dos níveis de exposição à radioatividade natural. A escolha dessas plantas como bioindicadores foi devido a apresentarem respostas entre 71% a 91,5% de concordância com os testes realizados com células de mamíferos expostas a diferentes agentes mutagênicos (GRANT, 1978; GRANT, 1982; GROVER *et al.*, 1990), além das células de cebola

conservarem uma boa concordância com os efeitos observados em células de sangue periférico humano (FISKESJÖ, 1985).

Nesta dissertação, demos ênfase em determinar a partir de células vegetais, a ocorrência de danos radioinduzidos por baixos níveis de atividade provenientes dos radionuclídeos de uma rocha natural com baixas concentrações. Isso foi pensado como uma forma de tentar reproduzir o que pode acontecer quando esses elementos estão dentro do corpo, ou seja, nos casos em que há incorporação efetiva (que geralmente ocorre a baixas concentrações) em um determinado tecido/ órgão.

A relevância de se usar células vegetais para avaliação do efeito radiológico produzido por esses radionuclídeos durante exposições internas, reside no fato de que esses dados podem aprimorar o entendimento para incorporações efetivas desses elementos em pessoas. Como em locais que os concentram isso pode ocorrer frequentemente, porém, em concentrações baixas nas quais inexistem estudos indicando risco para as populações, o desenvolvimento desse trabalho torna-se promissor, sobretudo, no que se refere a futuramente se estabelecer uma relação com as doses resultantes e, conseqüentemente, com os danos produzidos. Isso, por sua vez, pode ser um recurso precursor para avaliar o potencial de carcinogêneses serem radioinduzidas por baixas doses devido ao acúmulo diário desses danos.

1.1 OBJETIVOS

Este estudo é destinado à obtenção de dados referentes a possíveis danos celulares radioinduzidos em indivíduos expostos frequentemente a baixas concentrações de radionuclídeos. Para tanto, foi proposto e desenvolvido um cenário a partir de bioindicadores vegetais germinados em placa de Petri na presença de 0,25 g, 0,50 g, 0,75 g e 1,00 g de estéril de urânio. A amostra utilizada foi cedida pela INB (Indústrias Nucleares do Brasil) e extraída dos solos da mina de exploração de urânio em Caetité – BA.

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o risco radiológico devido às exposições internas provenientes de radionuclídeos naturais, dando ênfase ao ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K , através de mutações radioinduzidas em células de alface (*Lactuca sativa*) e de cebola (*Allium cepa*) usados como bioindicadores.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Estimar as atividades do ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K da amostra de estéril de urânio;
- Cultivar raízes de alface e de cebola na presença de estéril de urânio, nas concentrações de 0,25 g, 0,50 g, 0,75 g e 1,00 g do material;
- Verificar possíveis alterações radioinduzidas e/ou por incorporação de radionuclídeos na estrutura bioquímica dos bioindicadores;
- Analisar a influência da variação do *background* radioativo no grau de danos induzidos em ambos os bioindicadores;
- Comparar a radiosensibilidade dessas células;
- Discutir a causa dos efeitos: Toxicidade e/ou radioatividade?
- Indicar se a exposição frequente à radionuclídeos naturais pode ser um potencial agente de risco à saúde.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 RADIOATIVIDADE NATURAL

A radioatividade é um fenômeno físico de liberação de energia excedente, proveniente de núcleos atômicos instáveis. É comum o público acreditar que só estará exposto a este evento durante episódios de desastres nucleares e/ou por ações antropogênicas (mineração, exames e tratamentos médicos que fazem uso de radiação etc). Porém, a maior parte da exposição sobrevém de fontes naturais e correspondem a aproximadamente 80% do valor total (EISENBUND, GESELL, 1997; KNOLL, 2010). Desse modo, todos os organismos vivos, incluindo o homem, evoluíram se adaptando aos diferentes níveis de atividade.

No que se referem às fontes naturais, a exposição é inevitável e frequente, uma vez que, elementos radioativos, como por exemplo, ^{238}U , ^{226}Ra , ^{222}Rn , ^{232}Th e ^{40}K , estão presentes em solos, águas subterrâneas e/ou superficiais, alimentos e bebidas, materiais de construção e, inclusive nos seres vivos – animais, plantas e no próprio homem. Assim, toda forma de vida terrestre é constantemente exposta à níveis de atividade toleráveis. Entretanto, a incorporação contínua de fontes de baixa taxa de dose pode elevar esses níveis de atividade no interior do corpo e, por essa razão, desencadear complicações (EISENBUND, GESELL, 1997; TURNER, 2007).

É sabido que todos os dias recebemos pequenas doses de radiação por meio de nossa dieta que, do ponto de vista clínico, não são prejudiciais. No entanto, recentemente a Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) demonstrou interesse em aprimorar os conhecimentos sobre a presença de radionuclídeos em alimentos, sobretudo, em circunstâncias que podem ocorrer elevação de seus teores (IAEA, 2017).

Alimentos cultivados em solos que possuem altos níveis de radioatividade de fundo (*background*), podem contar com teores acentuados de radionuclídeos e, conseqüentemente, oferecerem risco para quem os consomem frequentemente. Nesse contexto, enquadra-se, por exemplo, a região de Caetité e Lagoa Real, no Estado da Bahia, que abriga a única reserva de urânio em exploração do Brasil, cuja população sobrevive essencialmente de agricultura familiar. Estudos recentes indicam que os níveis de radiação no entorno de minas de urânio são maiores do que em outras localidades (GUIMARÃES *et al.*, 2011).

O urânio é o último elemento químico de ocorrência natural da tabela periódica, possuindo número atômico 92. O ^{238}U é o isótopo mais comum encontrado na natureza, com uma abundância relativa de 99,2739%, enquanto o ^{235}U corresponde a 0,7204% e o ^{234}U a 0,0057% (HAMMOND, HAYNES, 2012). A sua instabilidade nuclear intrínseca o torna um emissor espontâneo de radiação. Diversos minerais e rochas contêm diferentes teores de urânio e, portanto, abrigam também os produtos de decaimento de suas séries, além de outros radionuclídeos, como o ^{40}K . Os níveis de *background* radioativo são compostos, então, por todos esses elementos (BONOTO, 2004).

Apesar de que níveis baixos de radiação geralmente não oferecem riscos à saúde, se danos são constantemente radioinduzidos, podem ter efeito cumulativo e evoluírem para um estado deletério. Em proteção radiológica, são inúmeras as controvérsias sobre os reais efeitos que elementos de baixas taxas de doses podem induzir no interior do corpo, principalmente, quando se fala de incidência de câncer, pois não há um limiar de dose para que ocorra.

Nos últimos anos, há especulações de que a incidência de casos de câncer nos municípios de Caetité e Lagoa Real vêm aumentando significativamente quando comparada com as demais regiões da Bahia (GREENPEACE, 2008; ESTADÃO BRASIL, 2015). Como não há dados conclusivos, a mídia veicula notícias tendenciosas e precipitadas sobre contaminações causadas pela exploração indevida do urânio.

Exposições crônicas devido a incorporação de fontes de baixa radioatividade podem induzir efeitos adversos em seres vivos, incluindo o homem. Se esses danos ocorrem frequentemente, podem evoluir para uma lesão radioinduzida. Logo, regiões de potencial radioativo, como no entorno de minas de urânio, precisam de atenção no que se refere aos alimentos cultivados e desenvolvidos sob a influência de radionuclídeos naturais (EISENBUND, GESELL, 1997; BONOTO, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2011).

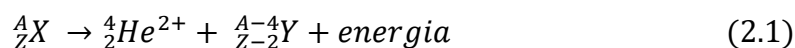
2.2 RADIAÇÕES NUCLEARES

Núcleos atômicos são sistemas que comportam quase toda a massa do átomo, sendo constituídos de núcleons (prótons e nêutrons). A disposição dessas partículas no seu interior obedece ao princípio de exclusão de Pauli, organizando-se em orbitais e níveis energéticos, sob a ação de campos de forças intensas e de curto alcance. Átomos, caracterizados pelos seus núcleos, recebem a denominação de nuclídeos. Quando apresentam os núcleons em orbitais estacionários, são espécies estáveis, porém, condições físicas diversas podem conduzi-los à instabilidade (EISBERG, RESNICK, 1979; TURNER, 2007).

A configuração de equilíbrio nuclear é perturbada principalmente pelo excesso de núcleons e/ou a sua alocação em estados excitados. Então, na tentativa de otimizar a estrutura e dinâmica, há emissão de radiação espontaneamente. Essa é a origem da radioatividade natural. Durante o evento, podem haver transformações de um elemento químico em outro se a emissão for particulada, ou apenas haver liberação da energia dispensável, sob a forma de fótons de alta frequência (CHUNG, 2001; TURNER, 2007).

Os nuclídeos instáveis são denominados de radionuclídeos e podem liberar o excedente de energia em uma só etapa, como também fazê-la através de vários decaimentos. Na crosta terrestre, existem aproximadamente 70 radionuclídeos, que expõem o homem a um campo de radioatividade natural através de emissões de partículas α , β e/ou de raios γ (EISENBUND, GESELL, 1997).

O decaimento α consiste na ejeção de um fragmento particulado, composto de 2 prótons e 2 nêutrons, provenientes de núcleos de átomos pesados. No domínio nuclear, a força forte (que age à curtas distâncias e mantém os núcleons unidos), predomina sobre as interações elétricas. Contudo, na medida que cresce o número atômico, os efeitos da repulsão mútua entre os prótons, que possuem carga positiva, se intensificam ao ponto de superá-la. Então, na tentativa de estabilizar-se, o núcleo instável libera uma partícula alfa, identificada como um núcleo de hélio duplamente ionizado, decaindo logo em seguida em 4 unidades de massa (2 prótons e 2 nêutrons) e dispensando grande quantidade de energia (TURNER, 2007), conforme é descrito pela equação (2.1):



onde, Z é o número atômico e A é o número de massa.

Para que ocorra esse tipo de decaimento são necessárias duas condições, em primeira instância, os 2 prótons e os 2 nêutrons devem estar juntos, formando uma partícula alfa ainda dentro do núcleo e, por último, essa partícula deve conseguir escapar do poço de potencial que lhe serve de armadilha. Geralmente, o excedente de energia é liberado como energia cinética pela partícula emitida, entretanto, pode apresentar-se parcialmente como energia de excitação do núcleo resultante (TURNER, 2007). Como o espectro de energia da radiação alfa é discreto, isso torna possível identificar radionuclídeos presentes em uma amostra, pois cada pico presente corresponde a uma transição/contagem em função de uma energia específica (EISBERG, RESNICK, 1979).

As partículas α são classificadas como lentas e pesadas e, por essa razão, tendem a percorrer uma trajetória retilínea no meio material. Por apresentarem carga elétrica dupla, sofrem forte interação coulombiana, tendo grande probabilidade de serem rapidamente freadas por outras partículas. Assim, como o poder de penetração é bastante reduzido, o seu alcance torna-se curto, motivo que torna a sua blindagem mais factível (ATTIX, 1986).

No que se refere ao corpo humano, para exposições externas a partícula alfa é inofensiva, uma vez que, as chances desse tipo de radiação atravessar a pele são praticamente inexistentes. Porém, para exposições internas, caso em que a fonte é ingerida, inalada ou absorvida, torna-se extremamente danosa, pois a partícula alfa é capaz de depositar grandes quantidades de energia em pequenos volumes (BIRAL, 2002).

O decaimento β é outro processo que envolve otimização de núcleos através da emissão de radiação particulada. Entretanto, nessa situação, a instabilidade nuclear se deve ao déficit ou excesso de nêutrons, que conforme a configuração apresentada, determina o tipo de partícula a ser emitida. São duas possibilidades existentes, são emitidos elétrons altamente energéticos ou pósitrons, representados pelas emissões β^- e β^+ , respectivamente (ATTIX, 1986; TURNER, 2007).

A emissão β^- ocorre quando o número de nêutrons no núcleo é maior em relação ao número de prótons. Então, a estabilidade é verificada via conversão de um nêutron em um próton, com a liberação de um elétron e de um antineutrino. Após esse tipo de decaimento, o núcleo resultante tem seu número atômico acrescido em uma unidade, porém, conservando a massa inalterada, conforme simbolizado pela equação (2.2):



No entanto, quando o excesso apresentado pelo núcleo for de prótons, a estabilidade virá por meio do decaimento β^+ , que converte um próton em um nêutron e emite um pósitron e um neutrino. Nesse arranjo, ao invés de crescer, o número atômico do núcleo resultante é reduzido em uma unidade, porém, mantendo o número de massa anterior, como mostrado pela equação (2.3):



Seja no caso β^- ou β^+ , o espectro de emissão β será sempre contínuo, tendo em vista que durante ambos os processos a energia é repartida entre o elétron (ou pósitron) e o antineutrino (ou neutrino).

As partículas β são rápidas e leves. Durante a sua trajetória sinuosa, depositam energia na matéria por interação coulombiana, ionizando moléculas ou átomos, porém, numa intensidade menor do que a das partículas α . Seu poder de penetração é moderado, e em relação ao homem oferece complicações tanto para exposições externas (pois podem possuir energia suficiente para penetrar a pele), como também internas, sendo o último caso o mais perigoso (BIRAL, 2002; TURNER, 2007).

A blindagem desse tipo de radiação deve ser feita com materiais de baixo número atômico, como por exemplo, plástico e/ou alumínio, pois caso contrário, ao incidir sobre a sua superfície irá interagir fortemente com o campo eletromagnético nuclear, produzindo radiação *bremsstrahlung*, conhecida também como raios X de freamento. A espessura da blindagem deve ser tal que, todas as radiações sejam absorvidas, ou seja, a sua profundidade deve ser maior do que o poder de penetração da partícula β no meio material (ATTIX, 1986).

A estabilidade do núcleo atômico só é alcançada variando a proporção entre prótons e nêutrons. Contudo, mesmo depois de passar por um decaimento α ou β , o núcleo remanescente pode ainda não dispor de seus núcleons na configuração de equilíbrio, pois estarão em estados excitados. Então, para retornarem ao estado fundamental, liberam a energia excedente sob a forma de fótons de alta frequência, denominados de raios γ . A emissão de raios gama provenientes de radionuclídeos, ocorre, então, secundariamente após passar por um outro decaimento.

Usualmente, o processo pode ser equacionado da seguinte maneira:



onde ${}^A_ZX^*$ representa o núcleo no estado excitado.

Os raios γ não dispõem de carga elétrica e nem tão pouco de massa, portanto, a otimização que acontece no núcleo, após a sua emissão, não modifica os números atômico e de massa, conservando o elemento químico de origem. Como a energia emitida possui dependência apenas com os níveis energéticos envolvidos, o espectro obtido é discreto, ou seja, com valores específicos (EISBERG, RESNICK, 1979).

Apesar de ser altamente penetrante, a radiação gama possui um baixo poder de ionização. A interação da radiação γ com a matéria se dá pela transferência de sua energia para outras partículas, sendo estas as responsáveis por ionizar os átomos do meio. Assim, são classificadas como indiretamente ionizantes. O seu alcance não pode ser previsto, devido ao potencial que têm de percorrerem longas distâncias até que interajam pela primeira vez. Geralmente, são utilizadas placas de chumbo e/ou espessas paredes de concreto para atenuá-la. Em relação ao homem, oferece grandes riscos, pois conseguem atravessar facilmente o seu corpo e ao interagir podem lhe causar uma série de danos (BIRAL, 2002).

2.3 GRANDEZAS E UNIDADES DE RADIAÇÃO

O decaimento de espécies instáveis é um processo randômico. Por conseguinte, não há como prever o instante exato que ocorre. No entanto, para uma amostra constituída de uma grande população de átomos radioativos, pode-se considerar que a quantidade de otimizações por segundo é proporcional ao número de átomos que estão por se otimizar naquele momento. Essa probabilidade, assumida como uniforme, recebe a denominação de constante de decaimento λ , que é característica de cada radionuclídeo (BONOTO, 2004; TURNER, 2007).

É importante mencionar, que uma transformação por segundo não significa a emissão de uma radiação por segundo, pois nesse intervalo de tempo podem ser emitidas várias radiações, inclusive de vários tipos, e de energias distintas.

Em Física das radiações, a grandeza que mede a taxa de transformações por instante de tempo é a atividade (A). Sendo $N(t)$, o número de átomos radioativos que ainda não decaíram no instante t , a atividade $A(t)$ pode ser expressa por:

$$A(t) = \frac{dN(t)}{dt} = -\lambda N(t) \quad (2.5)$$

onde o sinal negativo indica que o número de átomos radioativos diminui com o tempo.

Integrando-se a equação (2.5) e chamando de N_0 o número de átomos radioativos no instante $t = 0$, encontra-se:

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t} \quad (2.6)$$

A atividade $A(t)$ assume, então, a seguinte forma:

$$A(t) = \lambda N(t) = \lambda N_0 e^{-\lambda t} \quad (2.7)$$

O tempo de existência de um radionuclídeo pode ser calculado em função da sua atividade. Para tanto, considera-se o intervalo necessário para que a quantidade de átomos radioativos presentes em uma amostra decaia pela metade. Esse é o conceito de meia-vida ($T_{1/2}$) e cada vez que é obtida significa que a atividade foi reduzida à metade da anterior (BONOTO, 2004; TURNER, 2007).

Atualmente, o Sistema Internacional (SI) adota o becquerel (Bq) como a unidade de medida de atividade, que equivale a uma unidade de transformação por segundo. Essa unidade veio a substituir o curie (Ci) que, em sua definição inicial, corresponde ao número de transformações por segundo em um grama de ^{226}Ra , que é de $3,7 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$. Segundo Knoll (2010), 1 Bq equivale à $2,703 \cdot 10^{-11} \text{ Ci}$.

Na natureza, os radionuclídeos não se apresentam isolados, sendo geralmente encontrados como uma mistura de várias espécies combinadas a materiais inertes. Nesses casos, usa-se o conceito de atividade específica, que representa a atividade por unidade de massa (Bq/kg) ou volume (Bq/L). Essa grandeza depende das razões entre as misturas dos elementos difundidos a esse material (IAEA, 2010).

Quando a radiação interage com a matéria, pode haver transferência total ou parcial de sua energia para o meio. A quantificação dos níveis depositados por unidade de volume é verificada através da grandeza dose absorvida, cuja unidade é o gray (Gy).

Entretanto, quando se trata de padrões de radioproteção, deve-se levar em conta a variedade de efeitos biológicos que os distintos tipos de radiação podem desencadear. Nessas situações, a grandeza utilizada é a dose efetiva, pois considera fatores como o tipo de radiação, a área afetada e as vias de exposição. No SI, a sua unidade é o sievert (Sv), mas devido ao seu

valor ser relativamente alto, usa-se o milisievert (mSv) para medidas de dose efetiva em humanos (WHO 1, 2011).

A Tabela 2.1 mostra algumas grandezas usadas em Física das radiações e suas respectivas unidades no SI.

Tabela 2.1 – Algumas grandezas usadas em Física das radiações (OKUNO, YOSHIMURA, 2010).

Grandeza	Meio	Tipo	Unidade (SI)	Unidade Original	Conversão
Atividade	-	-	Bq = s ⁻¹	-	1 Ci = 3,7.10 ¹⁰ Bq
Atividade específica	-	-	Bq/L ou Bq/kg	-	
Dose absorvida	Qualquer	Qualquer	Gy (J/kg)	rad	1 Gy = 100 rad
Exposição	Ar	X, γ	C/kg		1 R = 2,58.10 ⁻⁴ C/ (kg de ar)
Dose equivalente	Órgão ou tecido	Qualquer	Sv	rem	1 Sv = 100 rem
Dose Efetiva	Corpo todo	Qualquer	Sv	rem	1 Sv = 100 rem

2.4 SÉRIES RADIOATIVAS NATURAIS

Núcleos muito energéticos não conseguem adquirir estabilidade através de um só decaimento. Quando a estabilização nuclear se transcorre em várias etapas, deixa pelo caminho subprodutos. Durante o processo, a espécie que é formada é mais organizada que a anterior, porém, se ainda dispõe de alguma “imperfeição”, o ajuste é novamente requerido e uma nova radiação é emitida. Esse mecanismo se repete até o núcleo remanescente alcançar a configuração de equilíbrio, tendo ao final originado uma família ou série radioativa, como é ilustrado nas Figuras 2.1, 2.2 e 2.3.

A radioatividade ambiental é composta pelas radiações provenientes desses sucessivos decaimentos de radionuclídeos, que estão presentes em toda parte, como em solos e rochas, pela interação da radiação cósmica com partículas de gases atmosféricos e devido a exposição aos radionuclídeos antropogênicos. No entanto, de toda a radiação que afeta o ser humano, aproximadamente 80% advém do decaimento de fontes naturais terrestres (BONOTO, 2004).

Os decaimentos das famílias do ^{238}U e do ^{232}Th seguidos pelo do ^{40}K são os maiores responsáveis pela composição dos níveis de radioatividade ambiental. Numa escala menor, a série do ^{235}U também oferece a sua contribuição, porém, em segundo plano, devido a carência isotópica que apresenta (EISENBUND, GESELL, 1997). É importante mencionar, que o tempo de meia-vida dessas espécies instáveis podem durar de frações de segundos até milhões de anos.

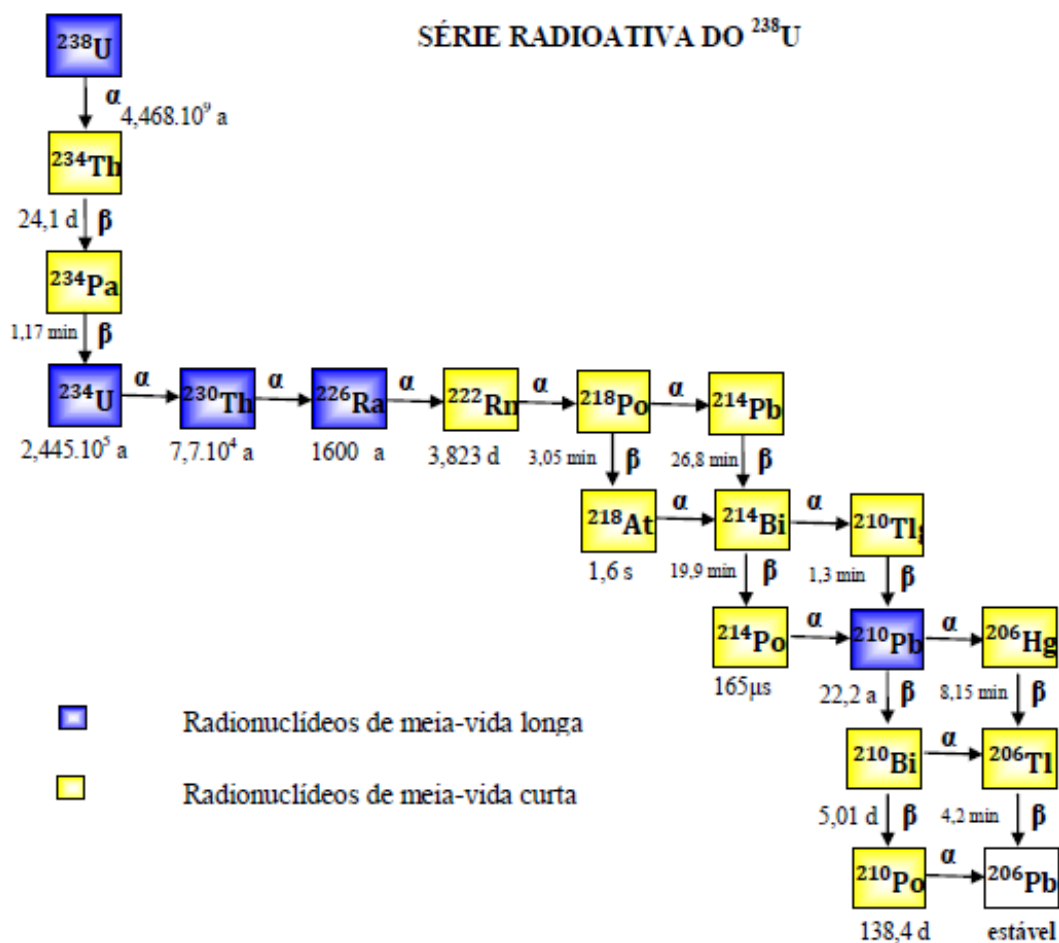


Figura 2.1 – Esquema da série de decaimento do ^{238}U . Os símbolos α e β e o tempo mostrado indicam o tipo de radiação emitida e as meias-vidas dos emissores, respectivamente (Adaptada de BONOTO, 2004).

Na busca pelo equilíbrio nuclear, o ^{238}U (Fig. 2.1) produz diversos descendentes radioativos. Dentre esses, merece destaque o ^{222}Rn , gás inerte natural que se acumula facilmente em locais fechados, tais como residências, construções, cavernas, entre outros. Quando

combinado com seus subprodutos não gasosos ^{214}Po e ^{218}Po , respondem por aproximadamente 50% da dose efetiva interna anual (MAGALHÃES *et al.*, 2003; ABUMURAD, 2005).

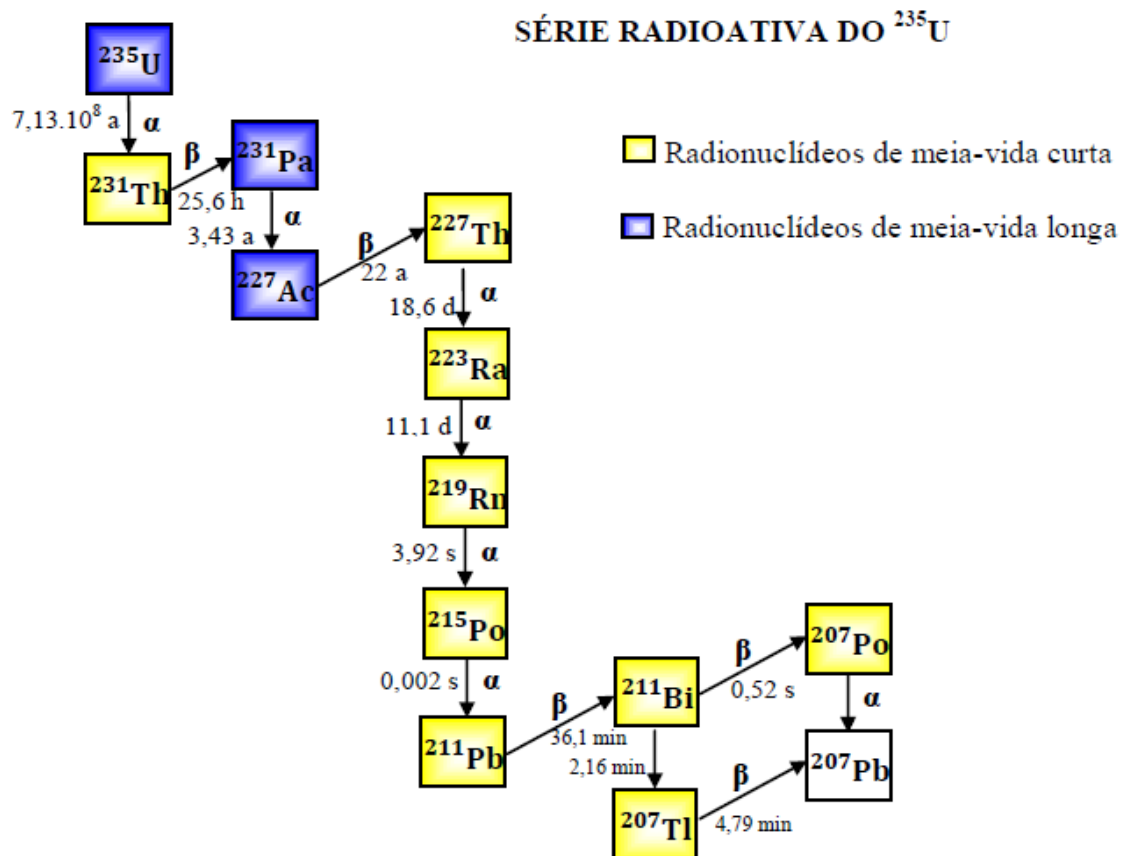


Figura 2.2 – Esquema da série de decaimento do ^{235}U . Os símbolos α e β e o tempo mostrado indicam o tipo de radiação emitida e as meias-vidas dos emissores, respectivamente (Adaptada de BONOTO, 2004).

A série do ^{235}U (Fig. 2.2) é a que possui menor probabilidade de detecção, uma vez que a porcentagem em massa do radioisótopo não chega a 1% em amostras naturais. Os decaimentos das séries do urânio ocorrem preferencialmente por emissões de partículas α ou β , porém, em algumas situações, podem vir acompanhados de emissão de radiação γ , quase que simultaneamente. Isso se deve ao fato de que após emitir uma partícula, o núcleo resultante ainda não dispõe da configuração de equilíbrio devido aos seus núcleons estarem em estados excitados.

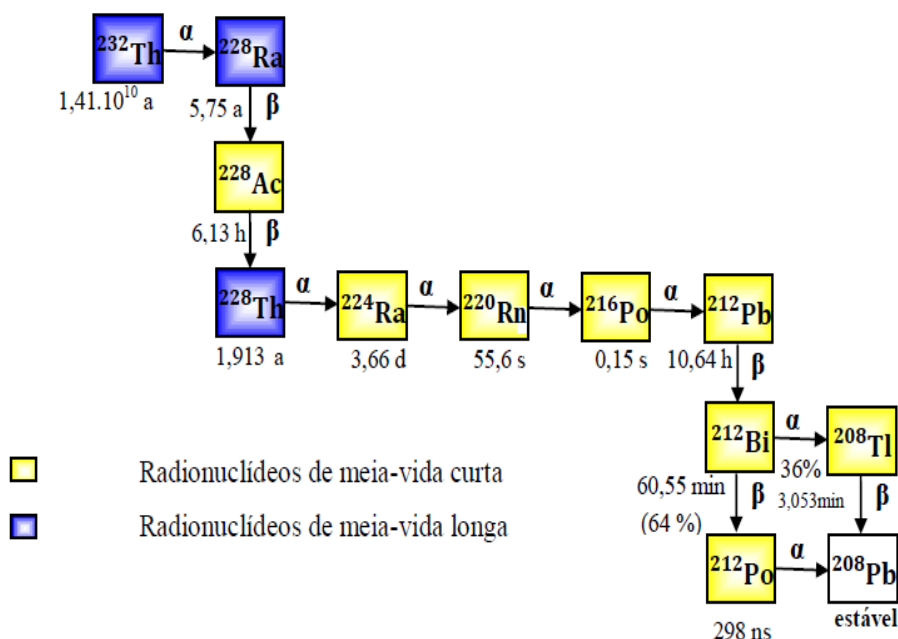
SÉRIE RADIOATIVA DO ^{232}Th 

Figura 2.3 – Esquema da série de decaimento do ^{232}Th . Os símbolos α e β e o tempo mostrado indicam o tipo de radiação emitida e as meias-vidas dos emissores, respectivamente (Adaptada de BONOTO, 2004).

Os níveis de radiação não são uniformes de uma região para outra, sobretudo, pelas diferenças geológicas e de altitude. Em geral, as doses internas variam numa média global de até 2,4 mSv/a, porém, há localidades que as excedem em até 200 vezes (EISENBUD, GESELL 1997; FROEHLICH, 2009).

Solos, minérios e/ou formações rochosas, que contêm significativas concentrações de urânio e tório, abrigam como consequência, os radionuclídeos decorrentes dos decaimentos de suas séries. Entre os subprodutos da série do ^{232}Th (Fig. 2.3), destaca-se o gás radioativo ^{220}Rn . Denominado de “torônio”, possui meia-vida de 55 segundos, transformando-se por emissão alfa no ^{216}Po , que também possui descendentes com meias-vidas muito curtas.

A presença desses elementos em fertilizantes e materiais de construção civil, podem elevar os níveis de exposição à radioatividade ambiental. O radônio e torônio, quando se acumulam em residências ou locais fechados, tornam-se potenciais agentes de risco. Devido aos seus elevados pesos atômicos, se concentram em áreas próximas ao solo, pois experimentam o efeito de decantação gravitacional. Por possuírem tempos de meia-vida

compatíveis com o metabolismo celular, quando inalados ou ingeridos, decaem ainda dentro do organismo, irradiando órgãos e tecidos (OJOVAN, LEE, 2005).

Na natureza, devido aos processos geológicos, que causam remoção ou adição de radionuclídeos de amostras ambientais, há um desequilíbrio radioativo frequente das séries descritas. Entretanto, quando um radionuclídeo pai possui uma meia-vida maior que qualquer um dos seus membros, pode-se estimar a atividade da amostra mediante o conceito de equilíbrio radioativo secular. Essa é uma condição para sistemas fechados, cujos filhos passam por no mínimo de 8 a 10 meias-vidas sem realizar trocas com o meio externo e, portanto, isolados. A sua validade deve-se ao fato de que a meia-vida de qualquer filho é desprezível em relação ao nuclídeo pai, logo, em um certo momento este irá decair com a mesma atividade que o progenitor da respectiva série (BONOTO, SILVEIRA, 2006).

2.5 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA

A radiação interage com os átomos que constitui o material no qual é incidida. Devido à disposição geométrica, ao número, à carga elétrica e ao movimento de partículas envolvidas, a probabilidade dessas interações ocorrerem com os elétrons é muito superior à probabilidade de interação com os núcleons, no caso de fótons ou partículas como alfa e beta, com exceção de nêutrons. Apesar disso, os fótons que possuem energia superior a energia de ligação nuclear, que é de aproximadamente 6 a 8 MeV, ao interagirem com o meio, podem ativar núcleos, desencadeando reações nucleares e, em consequência, tornando-os radioativos (ATTIX, 1986; TURNER, 2007).

De acordo com a sua natureza e tipo, as radiações podem ser classificadas em ionizantes e não ionizantes. Quando a radiação absorvida produz apenas excitações atômicas ou moleculares, limitando-se geralmente a geração de luz ou calor, recebem a denominação de não ionizantes. Porém, se a energia que possuem for suficiente para arrancar elétrons, modificando a configuração de átomos e moléculas e posteriormente resultando em quebra de ligações químicas, são chamadas de ionizantes. Os mecanismos de ionização podem ser tantos diretos quanto indiretos (BUSHONG, 2010).

2.5.1 Interação com fótons

Fótons são categorizados como radiações indiretamente ionizantes, uma vez que o processo de ionização acontece de maneira secundária, mediante a transferência de sua energia para elétrons que irão produzi-la.

Considerando-se a interação de fótons de raios X e γ com a matéria, a ionização pode se transcorrer através de inúmeros mecanismos, porém, os mais relevantes são o efeito fotoelétrico, o espalhamento Compton e a produção de pares.

O efeito fotoelétrico ocorre quando um fóton incide sobre um átomo e é absorvido, transferindo toda a sua energia $h\nu$ para um elétron orbital de camadas mais internas, geralmente K ou L, provocando a sua ejeção (ATTIX, 1986; TURNER, 2007). A energia cinética E_c com a qual o elétron é ejetado é obtida através da equação (2.8):

$$E_c = h\nu - E_{Lig} \quad (2.8)$$

onde E_{Lig} representa a energia de ligação do elétron orbital.

Em alguns materiais, como por exemplo os metais, fótons na faixa do visível ou do ultravioleta, conseguem arrancar elétrons fracamente ligados da sua superfície, ejetando-o. Contudo, o efeito fotoelétrico considerado aqui é o produzido por fótons de raios X ou γ , que por serem mais penetrantes, ocorrem no interior de materiais que têm elétrons fortemente ligados.

A predominância fotoelétrica depende da radiação incidente ser de baixa energia e do material possuir elevado número atômico, porém, quando a energia dos fótons começa a crescer e alcança valores de aproximadamente 100 keV até 1 MeV, a probabilidade de ocorrência passa a ser do espalhamento Compton (XAVIER *et al.*, 2006).

O espalhamento Compton é um processo de transferência parcial da energia de um fóton incidente ao colidir inelasticamente com um elétron livre, que continua a sobreviver dentro do material, porém, em outra direção (EISBERG, RESNICK, 1979; ATTIX, 1986; TURNER, 2007). Durante essa interação, a energia do fóton é parcialmente absorvida, e o mesmo é desviado pelo elétron, espalhado com uma energia menor do que a original, descrita pela equação (2.9):

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \left[\frac{h\nu}{m_0 c^2 (1 - \cos \theta)} \right]} \quad (2.9)$$

onde $h\nu$ é a energia do fóton incidente, $h\nu'$ a energia do fóton espalhado, $m_0 c^2$ a energia de repouso do elétron e θ é o ângulo formado entre o fóton incidente e o espalhado (EISBERG, RESNICK, 1979)

Quando a energia dos fótons atinge valores iguais ou superiores a 1,022 MeV, começa a predominar o efeito de formação de pares. Nesse tipo de interação, um fóton que possui essa faixa de energia pode interagir com o núcleo atômico e, ao fazê-lo, cede toda a sua energia $h\nu$, criando o par elétron-pósitron, que é ejetado com ganho de energia cinética. Entretanto, devido ao pósitron dissipar facilmente a sua energia, ao combinar-se com um elétron do meio, ambos se aniquilam, dando origem a dois fótons de radiação gama, que saem em direções opostas, cada um com 511 keV de energia (EISBERG, RESNICK, 1979; ATTIX, 1986; TURNER, 2007).

2.5.2 Interação com partículas carregadas

Partículas eletricamente carregadas interagem através de campo elétrico coulombiano, transferindo energia para elétrons orbitais do meio. Esse tipo de interação, configura o mecanismo direto de ionização da matéria. Em relação à proximidade da “colisão”, o impulso que transmitem ao elétron pode promovê-lo a uma camada superior, caracterizando o processo de excitação, ou ainda, provocar a sua ejeção do átomo, desencadeando a ionização (TURNER, 2007).

Quando uma partícula incidente interage com os elétrons, há uma diminuição de sua velocidade devido a transferência de sua energia. O valor máximo que uma partícula carregada de massa m e de energia E pode transferir para um elétron de massa m_0 durante uma colisão simples é de $4 \cdot E \cdot m \cdot m_0 / (m + m_0)^2$. Isso significa que quando $m \gg m_0$ as perdas de energia por colisão serão baixas, por conseguinte, a partícula primária sofrerá várias interações durante a sua trajetória dentro do material, até que seja efetivamente freada (EISBERG, RESNICK, 1979; ATTIX, 1986; TURNER, 2007).

Com as inúmeras colisões e eventuais emissões de radiação de freamento, as partículas carregadas penetram em um material até que a sua energia cinética seja baixa o bastante para capturar elétrons do meio, no caso de partículas alfa, ou para que estes sejam capturados pelos átomos do material, no caso de elétrons. Isso define o alcance R no meio absorvedor, após percorrerem uma trajetória direta ou aleatória. As partículas α tendem a percorrer um caminho praticamente retilíneo, com um alcance curto devido a carga dupla que possuem. Porém, a trajetória e alcance de elétrons primários é algo irregular devido a repulsão mútua que sofrem com os elétrons do material, podendo inclusive ser defletidos para a direção de origem (ATTIX, 1986; TURNER, 2007).

Embora o conceito de alcance não se aplique para fótons de raio X e γ , um conceito correspondente para a radiação eletromagnética seria o de atenuação exponencial, que descreve a diminuição da intensidade de um feixe primário devido a probabilidade de interação fotoelétrica, Compton ou produção de pares. A Tabela 2.2, mostra o alcance em centímetros ou o percentual de atenuação das radiações ionizantes para 100 centímetros de ar e para 1 centímetro de tecido humano.

Tabela 2.2 – Interação das radiações ionizantes com o ar e tecido humano (Adaptada de TAUHATA *et al.*, 2003).

Tipo de radiação	Energia (MeV)	Material de interação			
		Ar		Tecido humano	
		Alcance (cm)	Atenuação (%) X = 100 cm	Alcance (cm)	Atenuação (%) X = 1 cm
α	5,5	4	-	0,005	-
β	1	300	-	0,4	-
γ	1	-	0,8	-	6,9
	0,030	-	7,7	-	30
X	0,060	-	4,2	-	17,5

Os efeitos mais comuns ocasionados por partículas carregadas são átomos excitados ou pares de íons, sendo o último o mais acentuado. Os pares de íons são espécies formadas pelo

elétron arrancado (que agora se encontra livre no material), e pelo íon positivo gerado devido à sua remoção do átomo. Em algumas situações, os elétrons que são ejetados podem sair com energia cinética alta, suficiente para produzir outras ionizações, sendo denominados de raios delta. Esse mecanismo representa a forma indireta que partículas carregadas transferem a sua energia para a matéria (ATTIX, 1986; TURNER, 2007).

A quantificação da transferência de energia de uma partícula carregada para o meio pode ser avaliada através de um parâmetro conhecido como poder de freamento linear S (*stopping power*). Esse parâmetro é definido como a taxa de energia perdida pela partícula dentro do material por unidade de comprimento, representada pela equação (2.10):

$$S = -\frac{dE}{dx} \quad (2.10)$$

A perda de energia depende do quadrado da carga da partícula, aumenta quando a velocidade diminui, e a massa só afeta a forma de sua trajetória (ATTIX, 1986; TURNER, 2007).

Desprezando-se as perdas devido às reações nucleares, o poder de freamento linear S é dividido em duas componentes, uma relacionada as perdas por colisões e outra à radiação de freamento. A importância dessa separação reside no fato de que a energia perdida por colisão geralmente é absorvida próxima à trajetória, enquanto que a energia perdida por radiação de freamento é empregada para criar fótons, que podem interagir a distâncias grandes em relação ao ponto em que foram gerados e, portanto, ter a sua energia dissipada longe do ponto da interação inicial (ATTIX, 1986; TURNER, 2007).

2.5.3 Deposição macroscópica de energia – Dose e LET

Em um material, os efeitos produzidos pela radiação podem ser mensurados através do conceito de dose absorvida. Essa grandeza é definida como sendo o valor médio da energia depositada pela radiação incidente por unidade de massa pontual, tendo o gray (Gy) como unidade.

Conforme será descrito mais adiante, os danos biológicos provocados na matéria se relacionam com o número de ionizações que a radiação produz. Durante a trajetória da radiação dentro de um material, uma parte de sua energia é consumida pelas ionizações dos átomos, que

liberam elétrons de determinadas energias cinéticas. Como a energia depositada é proporcional ao número de ionizações existentes, a dose se relaciona diretamente com o dano biológico produzido, que também sofre influência do tipo e da energia da radiação incidente.

A frequência e a gravidade de danos biológicos causados por radiação dependem de um fator conhecido como Transferência Linear de Energia. A *LET*, acrônimo de *Linear Energy Transfer*, é um parâmetro que avalia a perda média de energia de partículas primárias, por colisão, ao longo de um trajeto, por unidade de distância percorrida. Embora esse conceito provenha de uma simplificação do poder de freamento de colisão linear, é importante mencionar que a *LET* expressa o efeito da partícula no meio, geralmente no tecido humano, enquanto que o poder de freamento (*stopping power*) expressa o efeito do material na partícula (PODGORSK, 2005).

As radiações podem ser classificadas como de alta ou baixa *LET*. As radiações de alta *LET* são aquelas que possuem um alto poder de ionização e uma alta taxa de transferência de energia para o meio, como por exemplo, partículas alfa, íons pesados e fragmentos de fissão.

Apesar da *LET* ser um conceito para partículas, sua definição também é válida para fótons de raios *X* e γ , uma vez que, após a primeira interação com a matéria, podem surgir elétrons secundários devido ao efeito fotoelétrico, espalhamento Compton ou produção de pares. Essas radiações, classificadas como indiretamente ionizantes, enquadram-se na categoria de baixa *LET*, pois a deposição de dose é realizada pela partícula secundária que liberam no meio.

Ao interagirem com um mesmo material, radiações de alta e baixa *LET* podem depositar uma mesma dose. Porém, isso não significa que os danos biológicos serão os mesmos, pois ainda que a energia depositada seja igual, a distribuição espacial dos processos de ionização será diferente. Conforme é ilustrado na Figura 2.4, ao se comparar a interação de elétrons secundários liberados por radiação gama (baixa *LET*) e a de partículas alfa (alta *LET*) com uma molécula de DNA (acrônimo de *DeoxyriboNucleic Acid*), observa-se que o número de ionizações/excitações produzidas ao longo da trajetória das partículas alfa é mais acentuado. Por isso, esse tipo de radiação pode causar danos até 20 vezes maiores do que iguais valores de dose de radiação *X*, γ ou β (BIRAL, 2002; BUSHONG, 2010).

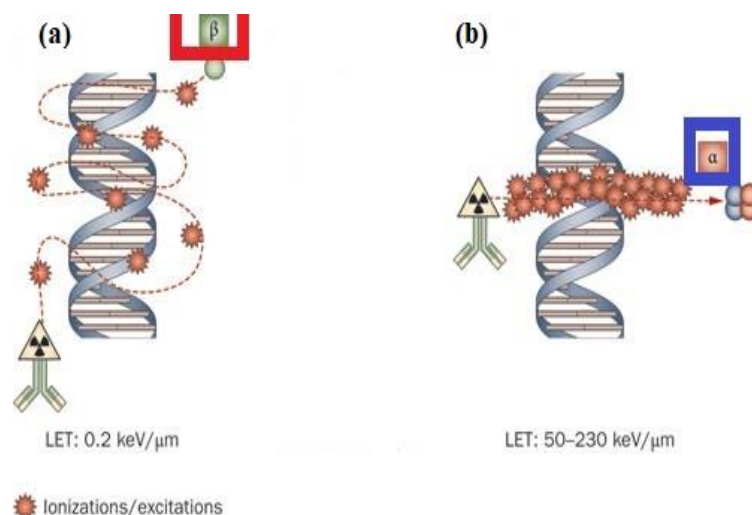


Figura 2.4 – Ionizações/excitações produzidas por radiação beta (a) e alfa (b) na molécula de DNA (POUGET *et al.*, 2011).

Diante disso, para análises de dose absorvida em órgãos ou tecidos, esta deve ser multiplicada por um fator de peso W_R de acordo com o tipo de radiação incidente (IRCP, 2011).

Tabela 2.3 – Valores de fator de peso W_R para diferentes tipos de radiação (Adaptada de KNOLL, 2010).

TIPO DE RADIAÇÃO		W_R
Fótons, todas as energias		1
Elétrons e múons, todas as energias		1
Nêutrons com energia	10 keV	5
	> 10 keV a 100 keV	10
	> 100 keV a 2 MeV	20
	> 2MeV a 20 MeV	10
	> 20 MeV	5
Prótons (não de recuo) com energia	> 2 MeV	5
Partículas α , fragmentos de fissão e núcleos pesados		20

Além da *LET*, a taxa de dose – quantidade de radiação liberada por unidade de tempo – é um fator físico que pode contribuir significativamente para a produção de danos biológicos. Essa grandeza, para fins de radioproteção, normalmente é medida numa escala de valores muito baixos, na ordem de mGy/h, por exemplo. Por essa razão, ainda não há estudos epidemiológicos suficientes que possam estabelecer com segurança o limiar de mutagêneses/carcinogêneses radioinduzidas, já que muitos outros agentes também podem desencadeá-las.

Em regiões de *background* radioativo, como por exemplo, no entorno de minas de urânio, o uso de bioindicadores vegetais pode ser um recurso promissor para se verificar a existência de situações de risco, decorrentes da exposição crônica à radionuclídeos naturais. Essas espécies, permitem determinar os efeitos de elementos de baixa radioatividade sobre organismos vivos, e com o auxílio de técnicas físico-químicas, verificar se houve ou não incorporação.

Desse modo, desde que se delimite /caracterize a área de estudo e se conheça a taxa de dose, a frequência de danos radioinduzidos pode ser relacionada com a estimativa de dose absorvida. Isso, por sua vez, permite construir uma curva de dose-resposta mais próxima do real, denotando o que se conhece por biodosimetria. Essa é uma ferramenta complementar e/ou alternativa à dosimetria física, sobretudo, em situações que a mesma não possui informações suficientes para estimar a dose (IAEA, 2001; ROCHEDO, 2003).

2.6 RADIOBIOLOGIA

Em materiais biológicos, a avaliação de efeitos radioinduzidos é feita através da radiobiologia, ramo da ciência que une princípios de Física e Biologia para desvendar a ação da radiação sobre células. A célula é a unidade elementar de todo tecido/órgão. Dentre os seus constituintes, se destacam o citoplasma, responsável por controlar funções metabólicas internas, e o núcleo, que armazena a informação genética (PODGORSK, 2005; BUSHONG, 2010).

Nos organismos eucarióticos, o material genético de uma célula é constituído por longos filamentos de DNA, que são dispostos em cadeias pareadas, compondo um aspecto de dupla hélice. Cada cadeia é constituída por subunidades, denominadas de nucleotídeos. Os nucleotídeos são formados por grupos fosfatos e resíduos de açúcar, organizados

alternadamente, e ligados à uma das bases nitrogenadas, adenina (A), citosina (C), guanina (G) ou timina (T), conforme ilustrado na Figura 2.5 (BUSHONG, 2010).

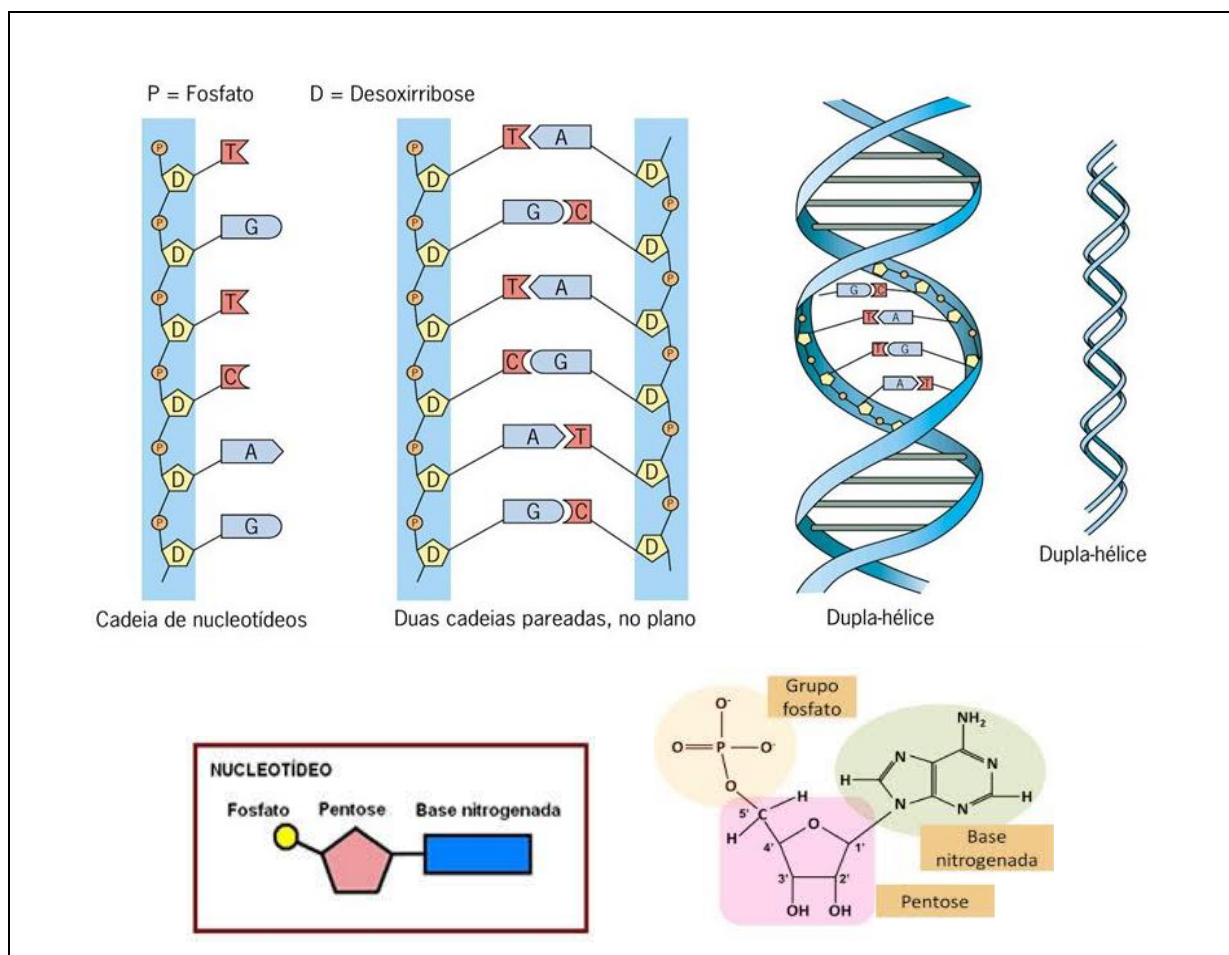


Figura 2.5 – Esquema da estrutura de dupla hélice do DNA (WIKIPÉDIA, 2018).

Para formar um determinado tecido, as células se multiplicam por processos de divisão celular. A característica de dupla hélice do DNA é fundamental para essa multiplicação, uma vez que para essa ocasião, precisa ser duplicado. Nesse arranjo, as duas cadeias da molécula se separam, originando dois moldes, cada um dos quais, por complementação com os nucleotídeos adequados, produz uma nova molécula, idêntica à original. Estas serão transmitidas para as células filhas, por mitose ou por meiose (BUSHONG, 2010).

A mitose é o processo predominante para células somáticas. No corpo humano, as células somáticas são quaisquer células que não sejam células sexuais. Durante a mitose, uma célula progenitora duplica o seu material genético e o divide igualmente entre duas células. As

novas células, mantendo a sua capacidade reprodutiva, podem sofrer uma nova divisão adicional, e o processo continua. A mitose é necessária para o crescimento e regeneração de tecidos. Além disso, substitui células mortas, danificadas ou com curtos períodos de vida (BUSHONG, 2010).

Quando a radiação interage com o tecido biológico, parte da sua energia é dissipada apenas produzindo excitações ao meio. Entretanto, quando a energia que transporta é superior à energia de ligação dos átomos do alvo, pode haver quebra de ligações químicas e, em função disto, ocorrer alterações moleculares. Dos danos mais importantes, se destacam os relacionados à molécula de DNA, classificada como alvo crítico. As consequências ao alvo crítico, podem ocorrer direta ou indiretamente (PODGORSK, 2005; BUSHONG, 2010).

Em um organismo biológico, a molécula de água é a mais abundante, com cerca de 2×10^{25} moléculas por quilograma de tecido. Assim, ao ser irradiada pode ser facilmente ionizada. Em seguida, acontece a radiólise – dissociação da molécula de água em pares de íons. Após isso, tanto o íon positivo quanto o íon negativo podem se recombinar eletronicamente no meio e produzir radicais livres (H^+ e OH^-). Como essas espécies são altamente reativas, podem interagir quimicamente entre si ou com moléculas próximas a elas. Como consequência, novas moléculas são danificadas, inclusive a do DNA, que pode sofrer quebras simples ou duplas de suas cadeias (PODGORSK, 2005).

Na ação direta, a radiação interage prontamente com o DNA, ionizando átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e fósforo, causando rupturas em sua estrutura.

Não é possível identificar se uma dada interação com o alvo crítico resultou de efeito direto ou indireto. Entretanto, considerando que o corpo humano consiste de aproximadamente 75% de água e menos de 1% de DNA, pressupõe-se que os efeitos da irradiação *in vivo* sejam essencialmente desencadeados pela ação indireta. Quando o oxigênio está presente, como no caso de tecidos vivos, os efeitos indiretos são amplificados devido à formação de tipos adicionais de radicais livres (BUSHONG, 2010).

Qualquer um dos tipos de quebra da molécula de DNA resulta em liberação de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros. Perdas de material genético impossibilita o processo de multiplicação celular ou, ainda, desencadeia apoptose – morte celular programada. Contudo, se as células escapam do estágio de apoptose, acumulam mutações, que podem evoluir para o desenvolvimento de um tumor. Além disso, quando o material genético liberado consegue se reagrupar, pode originar cromossomos aberrantes, ou seja, modificados em relação a estrutura original. Células contendo esse tipo de cromossomo podem se duplicar

e dar origem a uma população de células anormais, afetando seriamente o funcionamento de um tecido/ órgão, que deixa de executar funções vitais (PODGORSK, 2005).

Tanto a ação direta (ionização) quanto a indireta (ataque através de radicais livres), expõem o DNA a dois tipos de danos: mutações gênicas e quebras da estrutura de dupla hélice. É importante mencionar, que nem toda mutação é maléfica ao organismo. No entanto, mutações cumulativas podem evoluir para carcinogêneses, porém, para essas análises o que se observa é a probabilidade em relação a células não irradiadas. O tipo e o grau do dano, por sua vez, dependerá da dose, da taxa de dose, do seu fracionamento, do tipo de radiação, do tipo da célula, entre outros fatores.

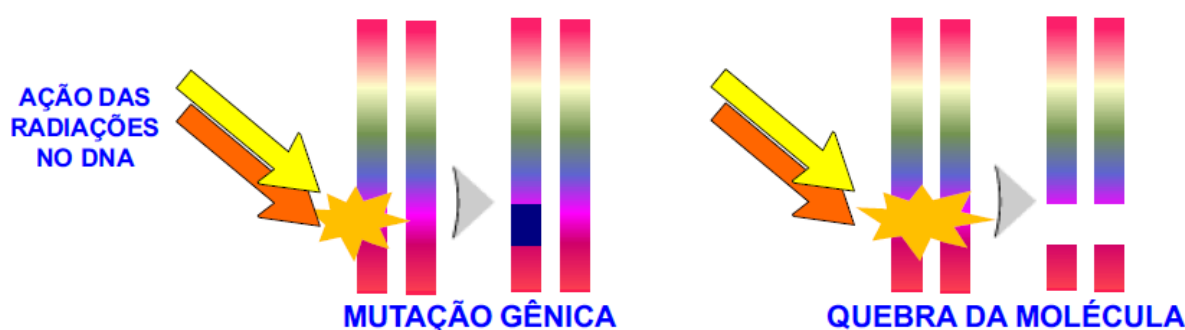


Figura 2.6 – Esquema dos principais danos induzidos por radiação à molécula de DNA (Adaptada de CNEN, 2001).

O mecanismo de reparo do DNA é mais eficiente para danos produzidos por baixas taxas de dose, porém, para exposições frequentes e crônicas, ou seja, por longos períodos, podem acontecer reparos errôneos. Nesses casos, surgem mutações nas bases nitrogenadas ou falhas mais grosseiras, que são corrigidas através de morte celular ou de alterações no material genético das células sobreviventes. Embora não necessariamente signifiquem um estágio de lesão, se tais efeitos passam a ser cumulativos, podem evoluir para um estado deletério.

Esse processo é conhecido como transformação neoplásica. Nessa situação, a célula alterada, mantendo a sua capacidade reprodutiva, potencialmente, pode evoluir para uma carcinogênese. As etapas desse mecanismo são apresentadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Evolução temporal e ação das radiações no tecido biológico (Adaptada de MILIAN, 2006).

Etapa	Tempo	Eventos
Física	10^{-18} s	Partícula ionizante atravessa a molécula – Ionização
Físico-química	10^{-15} s	Excitação – vibração e/ou dissociação molecular, termalização dos elétrons
Química heterogênea	10^{-12} s	Difusão dos radicais livres
Química homogênea	10^{-10} s	Reação dos radicais livres com o soluto
	10^{-8} s	Formação dos produtos moleculares
	10^{-6} s	Conclusão das reações químicas
Bioquímica	1 s	Reações enzimáticas, processo de reparo
Biológica	1 h	Início dos processos que podem gerar instabilidade genômica, aberrações, mutações e morte celular
Efeitos primários	Dias	Morte das células tronco, danos ao tecido sadio e distúrbios celulares
Efeitos tardios	Meses	Fibroses, telangiectasia, danos na pele, danos na medula óssea e ao sistema sanguíneo
Carcinogênese	Anos	Surgimento de tumores e multiplicação desses

2.6.1 Micronúcleos na avaliação de danos celulares radioinduzidos

O efeito das radiações em estruturas biológicas é produzido pela absorção de sua energia durante a trajetória que percorrem no meio. Conforme os átomos vão se excitando e/ou se ionizando, a dinâmica das moléculas que compõe um material pode mudar significativamente. Ao se considerar uma célula, por exemplo, isso pode causar disfuncionalidades e, em último caso, induzir mutações e/ou carcinogêneses.

Efeitos tardios, como o câncer induzido por baixas doses de radiação, são bastante complicados de se preverem, sobretudo, pela possibilidade da causa ser confundida com outros fatores. Diante disso, a busca por novas metodologias, que possam identificar qualquer alteração biológica abaixo do nível de lesão, assume uma importância ímpar.

Uma das manifestações celulares mais investigadas em estudos epidemiológicos, diz respeito aos processos de dano e reparo da molécula de DNA. Nos casos em que os danos são reparados, a célula desempenha o seu papel normalmente, porém, quando não são, ou se são reparados erroneamente, há uma série de complicações tanto na célula progenitora como nas suas descendentes.

Entre os vários danos radioinduzidos, as quebras das fitas duplas do DNA são os mais difíceis de serem reparados. Esse efeito é muito mais acentuado para radiações de alta *LET*, como as partículas alfa, que deixam uma alta densidade de radicais livres pelo seu trajeto. Além disso, quando a *LET* atinge na célula um valor máximo de 100 keV/ μ m, podem ocorrer dois eventos de ionização que coincidem com o diâmetro da distância entre cada hélice que forma a molécula de DNA, que é de aproximadamente 2 nm (HALL, 1994; IAEA, 2001).

Em nível citogenético, os danos não reparados (ou mal reparados) devido a essas quebras, são expressos sob a forma de aberrações cromossômicas na metáfase, e de micronúcleos na interfase. Esses parâmetros são amplamente utilizados pela comunidade científica para avaliar a probabilidade dos danos induzidos por radiação evoluírem para o estágio de lesão (COUNTRYMAN, HEDDLE, 1976; STREFFER *et al.*, 1998, IAEA, 2001; VALGODE *et al.*, 2017).

Os danos genéticos podem ser causados por agentes clastogênicos ou aneugênicos. O primeiro tipo se refere às substâncias que ao romperem a estrutura do DNA, liberam fragmentos de cromossomos, enquanto que o segundo, liberam cromossomos inteiros. A radiação é tanto clastogênica quanto aneugênica, e o teste de micronúcleo é capaz de detectar ambos os fenômenos (EASTMOND, TUCKER, 1989).

Os micronúcleos (MN) são corpúsculos esféricos e extranucleares, geralmente encontrados ao lado do núcleo principal, porém, sem nenhuma conexão estrutural com ele, conforme ilustrado na Figura 2.7. A sua semelhança em forma, coloração e conteúdo de DNA facilita a sua detecção (FENECH *et al.*, 1999; FENECH, 2007).

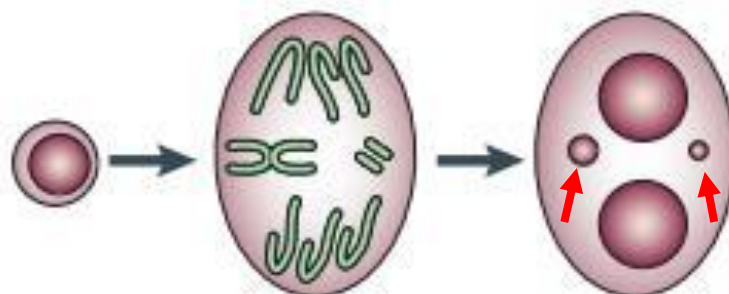


Figura 2.7 – Esquema da formação de micronúcleos (Adaptada de FENECH, 2007).

O número e o tamanho com que aparecem, depende do grau e do tipo de alteração cromossômica que os originaram. O tamanho do MN varia conforme o agente indutor. Assim, agentes aneugênicos induzem MN maiores, uma vez que, nesse caso, são provenientes de cromossomos inteiros.

O aumento da frequência de células com MN permite indicar previamente efeitos genotóxicos, que poderão ou não se desenvolver para um efeito tardio, como o câncer. Em testes humanos, geralmente usa-se células sanguíneas de linfócitos periféricos, pois estas apresentam vantagens frente a outros tipos celulares, sobretudo, por possuírem maior radiosensibilidade e por circularem por todos os órgãos do corpo (WATANABE *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 2007).

Embora existam diferenças pontuais entre células eucarióticas animais e vegetais, certas estruturas são comuns em ambas, conforme ilustrado na Figura 2.8. Por esse motivo, os mecanismos de resposta às substâncias genotóxicas geralmente são conservados tanto em plantas quanto em animais.

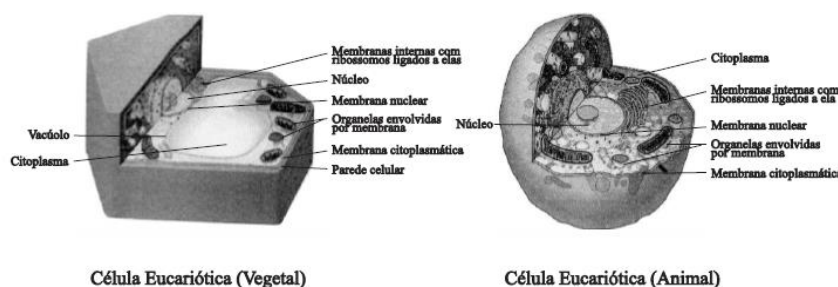


Figura 2.8 – Diagramas típicos de células vegetal e animal, respectivamente (TAUHATA *et al.*, 2003).

Nesse contexto, células meristemáticas¹ vegetais são amplamente usadas como bioindicadores, destacando-se as de cebola (*Allium cepa*) e as de alface (*Lactuca sativa*). O modelo com alface é considerado eficiente para indicar efeitos de contaminantes encontrados em solos (VALERIO, GARCIA, PEINADO, 2007), alelopatia² (CAMPOS *et al.*, 2008), ou ainda, efeito inibitório de radiações ionizantes (EASTMOND, TUCKER, 1989; BARROS *et al.*, 2002). No entanto, a referência largamente encontrada na literatura se concentra sobre análises com células de cebola. São inúmeros os trabalhos que as usam como bioindicador e, a razão para isto reside no fato de que quando comparada com testes de origem animal, apresenta sensibilidade similar aos testes realizados com linfócitos humanos (FISKESJÖ, 1985), além de oferecer uma alta correlação com estudos em roedores (RANK, NIELSEN, 1994).

O teste de micronúcleo é uma das opções mais recomendadas pela Agência Internacional de Energia Atômica para se realizar biodosimetria. Segundo a recomendação, devem ser analisadas entre 500 e 1.000 células. Dentro desse intervalo é considerado normal até 3% de células com micronúcleos (IAEA, 2001). A importância da técnica se deve ao fato de que, para valores que excedam esse limite, existe uma tendência ao aumento da probabilidade de se desenvolver câncer ou doenças genéticas, pois esse é um método que quantifica danos não reparados (ou mal reparados), que podem evoluir para o estágio de lesão.

2.7 INSTRUMENTAÇÃO

2.7.1 Espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier

Toda técnica espectroscópica consiste em mensurar a intensidade da radiação eletromagnética absorvida durante a sua interação com uma amostra. Análises espectroscópicas na região do infravermelho são, em geral, qualitativas, e úteis para a caracterização estrutural de diversas matrizes. Sendo um método direto, não destrutivo e que requer um tempo de medida entre 8 e 20 segundos, permite identificar impurezas e/ou degradações presentes, sobretudo, em amostras orgânicas (GRIFFITHS, HASETH, 2007). Em análises radiobiológicas, contribui para avaliar a estrutura de tecidos, pois pode indicar a presença de radionuclídeos, ou ainda,

¹ Grupo de células caracterizadas pela capacidade de se dividirem indefinidamente, produzindo as novas células necessárias ao crescimento da planta.

² Dano provocado por uma planta em outro organismo, causado pela liberação no meio ambiente de contaminantes secundários tóxicos.

determinar se houve ação degradante sob as moléculas que o compõe, decorrente de exposição à radiação ionizante (AMENABAR *et al.*, 2013).

Quando a radiação infravermelha interage com um material, pode ativar frequências específicas de ressonância correspondentes as ligações químicas dos átomos que o constitui. A detecção de compostos presentes na amostra é realizada através da formação de bandas e picos de absorção característicos, que estão associados às vibrações/rotações dessas ligações. Análises na região espectral do infravermelho médio ($4000\text{ cm}^{-1} \leq \bar{\nu} \leq 200\text{ cm}^{-1}$) geram dados detalhados sobre quaisquer alterações na composição química de amostras biológicas. Uma infinidade de espécies moleculares absorve luz infravermelha, porém, os padrões espectrais emitidos são característicos, produzindo uma “impressão digital” única para cada composto (GRIFFITHS, HASETH, 2007).

Entretanto, para reagir com radiação infravermelha, uma molécula deve ter variação no seu momento dipolar permanente, além de vibrar sobre uma ligação química (alterando o comprimento na distância internuclear – estiramento, ou modificando o ângulo de ligação – deformação), ou ainda, rotacionar sobre um eixo perpendicular a ligação (PETERSON, 1972). Portanto, nem toda espécie produz um espectro de infravermelho, como é o caso, do nitrogênio, do oxigênio e dos gases nobres.

Os espectros de infravermelho são obtidos através de equipamentos conhecidos como espectrômetros de infravermelho. Os espectrômetros direcionam a radiação infravermelha através da amostra e registra a quantidade relativa de energia que absorvem em função do comprimento de onda ou da frequência da radiação.

Atualmente, os equipamentos mais utilizados são os do tipo não dispersivos. Nesses modelos, o sistema de leitura é baseado na transformada de Fourier calculada numericamente.

Através de um espectrômetro interferométrico, que utiliza princípios do interferômetro de Michelson, é obtido um interferograma. Esse gráfico é composto por todos os sinais ondulatórios de diferentes amplitudes e frequências, sendo a sua interpretação bastante complexa. Então, mediante o cálculo da transformada de Fourier via algoritmos computacionais, são obtidos os espectros característicos de cada material analisado, conforme esquema ilustrado na Figura 2.9.

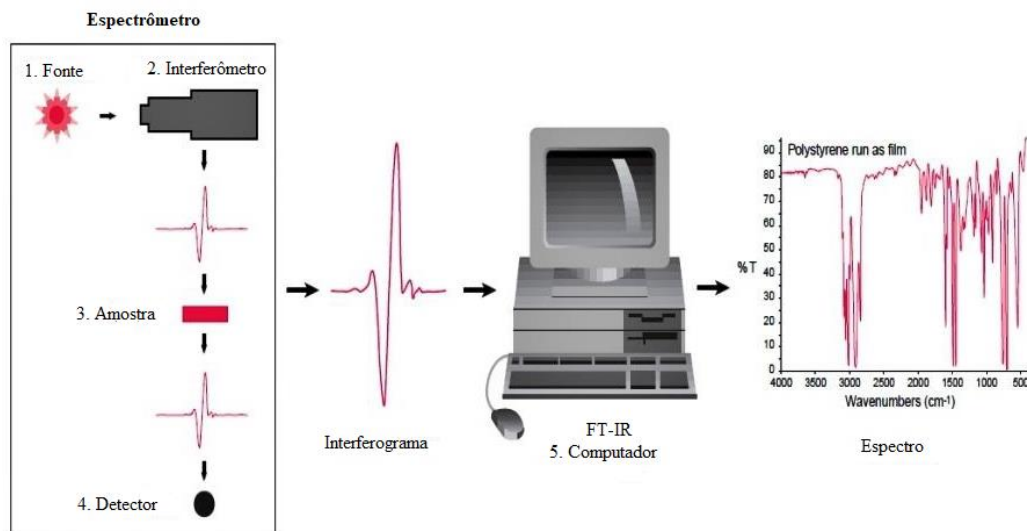


Figura 2.9 – Obtenção de espectros em FT-IR (Adaptado de OLIVEIRA, 2014).

O uso da transformada de Fourier sob o interferograma é realizado, então, para otimizar a relação sinal/ ruído e deixá-lo sob a forma de espectros ópticos resolvidos, permitindo assim, caracterizar a amostra em função dos comprimentos de onda ou das frequências da radiação infravermelha absorvidos (GRIFFITHS, HASETH, 2007).

2.7.2 Espectrômetro gama

A espectrometria gama é um método bastante requisitado em metrologia das radiações ionizantes. Entre as suas potencialidades, destaca-se a de aplicação em monitoramento ambiental, sobretudo, por ser um método não destrutivo, capaz de identificar e quantificar radionuclídeos em amostras de baixa atividade.

O decaimento gama por si só não é suficiente para estabilizar um núcleo atômico, pois só libera energia excedente. Desse modo, ocorre como consequência de um outro decaimento (alfa ou beta), em espécies que ainda não conseguiram atingir a estabilidade. Como já foi mencionado, essa emissão é necessária devido aos núcleons ainda não estarem alocados no estado fundamental.

Pela espectrometria gama o ^{40}K é detectado diretamente, pois geralmente emite radiação gama após sofrer o decaimento β . O ^{238}U e o ^{232}Th são essencialmente emissores alfa,

portanto, somente as suas atividades podem ser indiretamente estimadas por esse método. Isso é possível devido a presença de espécies emissoras de radiação gama em suas respectivas séries. Para esses casos pressupõe existir equilíbrio radioativo secular entre os membros. Geralmente são utilizados o ^{214}Bi e o ^{214}Pb para estimativa da atividade do ^{238}U e o ^{228}Ac e o ^{208}Tl para a atividade do ^{232}Th . Quando comparado com o ^{238}U , o ^{235}U e a sua série não contribuem significativamente para emissões gama devido à baixa abundância (SAPUCAIA, 2004).

Os fótons γ emitidos de radionuclídeos são resultado da transição entre um estado mais excitado para um menos excitado, sendo, portanto, uma energia discreta. A detecção é realizada através de sensores específicos de radiação, que os convertem em pulsos elétricos e, logo em seguida, os amplifica e processa através de um sistema eletrônico. O acúmulo desses pulsos origina os picos de absorção total. Ao final, o conjunto de picos em função das energias emitidas compõe um espectro, que é único para cada radionuclídeo, caracterizado pelo tipo de emissão radioativa, energia e intensidade (ou probabilidade de emissão) da radiação (KNOLL, 2010).

O espectro de emissão observado é resultado de diferentes interações da radiação gama (absorção fotoelétrica, espalhamento Compton e produção de pares) produzidas tanto no interior quanto no exterior do detector. Por essa razão, deve-se realizar calibrações em energia para garantir a posição correta do pico no espectro, que associada a energia conhecida emitida pelo radionuclídeo torna possível a sua identificação.

Além de identificar quais radionuclídeos estão presentes no espectro, pode-se também determinar qual a atividade específica média de cada emissor gama da amostra. Para tanto, usa-se a seguinte equação (IAEA, 1989):

$$A = \frac{N_L}{\varepsilon m t P_\gamma} \quad (2.11)$$

onde,

A é a atividade específica média do radionuclídeo ($\text{Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$);

N_L é a taxa líquida de contagens para a energia do raio gama (γ) do radionuclídeo contagens por segundo (cps);

m é a massa da amostra (kg);

ε é a eficiência de detecção do sistema na energia de interesse;

P_γ é a probabilidade absoluta de transição do raio gama (γ) medido;

t o tempo de contagem;

Entre os sensores mais utilizados em detectores de radiação gama, têm-se os semicondutores, destacando-se o germânio de alta pureza – HPGe. As vantagens do uso da espectrometria gama com esse tipo de detector são em geral devido a sua capacidade de distinguir energias muito próximas, tendo, portanto, alta resolução, a sua linearidade de resposta em uma ampla faixa de energia, e pelo tempo de coleta de cargas (aproximadamente 10^{-8} s) (ROSA, 2012). A Figura 2.10 representa um diagrama em blocos de um sistema típico de espectrometria gama.

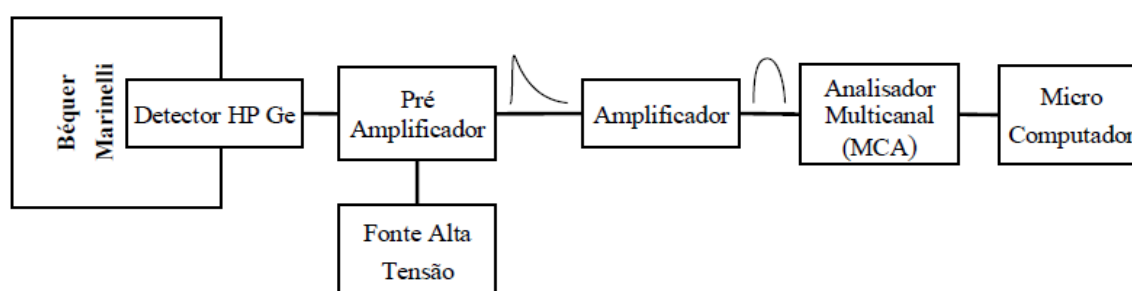


Figura 2.10 – Sistema do espectrômetro gama e as principais partes de funcionamento do equipamento (Adaptada de CROUTHAMEL *et al.*, 1970).

Nesse arranjo, uma fonte de alta tensão (0 – 5000 V) alimenta o detector, que é acoplado ao pré-amplificador para melhorar a relação sinal-ruído. O amplificador recebe o pulso de entrada (geralmente com cauda devido as possibilidades de polaridade) vindo do pré-amplificador, dando-lhe uma forma gaussiana e o amplificando. Logo em seguida, o analisador multicanal processa os pulsos lineares saídos da cadeia de medidas, separa-os em intervalos pequenos de amplitude (que correspondem a intervalos de energia) e finalmente se obtém o espectro de distribuição da energia da radiação. Os dados são então armazenados e interpretados com o auxílio de *softwares* de gerenciamento de multicanais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo se destina a analisar possíveis efeitos adversos causados pela exposição crônica à radionuclídeos naturais. Para tanto, usou-se bioindicadores vegetais expostos à diferentes concentrações de estéril de urânio. A amostra utilizada foi cedida pela INB e extraída dos solos da mina de exploração de urânio em Caetité – BA.

Nesse contexto, é de interesse desta dissertação a determinação das atividades do ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K presentes nesse material. Como já foi mencionado, esses elementos são os que mais contribuem para a elevação dos níveis de exposição à radioatividade natural. Também foram verificadas as possibilidades de incorporação desses radionuclídeos pelas plantas usadas como bioindicadores e de efeitos radiológicos produzidos sobre as suas células. Neste capítulo são apresentados os materiais, a metodologia aplicada na preparação e obtenção das amostras e os equipamentos e mecanismos utilizados para aquisição dos dados. O diagrama da Figura 3.1 demonstra as etapas do procedimento desenvolvido.

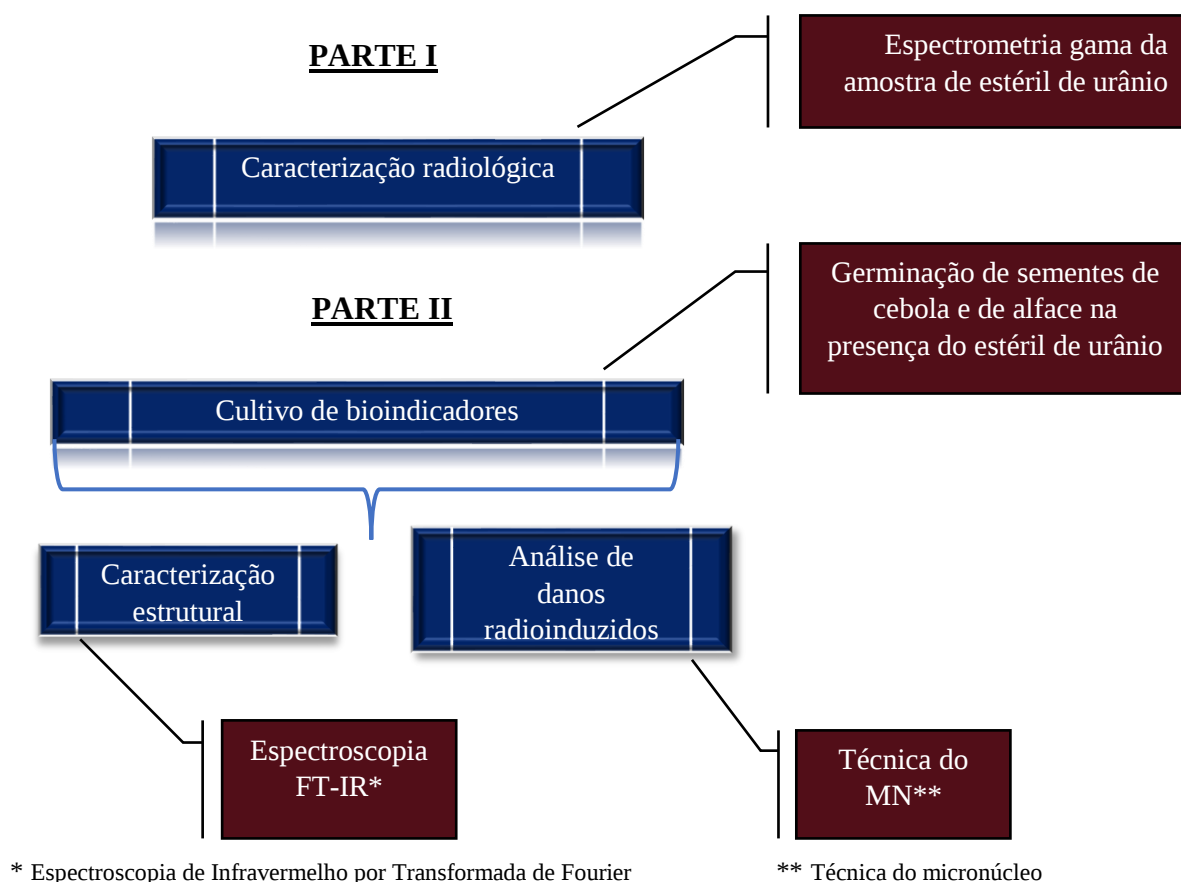


Figura 3.1 – Diagrama do procedimento desenvolvido para aquisição de dados.

3.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO CENÁRIO DE ESTUDO

Diversos estudos indicam que baixos níveis de radioatividade de fundo (*background*) emanados de rochas não oferecem perigo ao público. De fato, podem não oferecer para exposições externas, embora sejam retratadas controvérsias referentes ao radônio. (MAGALHÃES *et al.*, 2003; ABUMURAD, 2005; ANJOS *et al.*, 2005). Entretanto, para as exposições internas, esse panorama pode não se manter, principalmente quando há incorporação frequente de radionuclídeos através de alimentos e/ou água.

Diante disto, foi proposto e desenvolvido um cenário a partir de bioindicadores vegetais germinados na presença de diferentes concentrações de estéril de urânio, portanto, submetidos a influência da variação de uma baixa radioatividade de fundo (*background*). Foram

investigadas as hipóteses de danos radioinduzidos e/ou por incorporação. As plantas eucarióticas possuem mecanismos eficazes em metabolizar compostos estranhos a elas (oxidação, hidrólise e redução), além de contarem com processos de divisão celular e mutações similares aos do homem (FISKESJÖ, 1985; BARROS *et al.*, 2002).

Primeiramente foi realizada a caracterização radiológica do estéril oriundo da mina de exploração de urânio. Logo em seguida o experimento foi delineado a partir da germinação de sementes de alface e de cebola, durante 3 e 7 dias respectivamente, na presença de diferentes concentrações desse material. Os tempos de germinação são intrínsecos a cada uma dessas espécies. As sementes (ISLA) sem adição de defensivos/ agrotóxicos foram obtidas no comércio varejista de Vitória da Conquista – BA.

A montagem do cenário e posteriores análises de indução de micronúcleos foram realizadas no Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Executou-se um procedimento prévio de esterilização sobre os materiais do sistema (placa de Petri e papel de filtro de germinação) utilizado para germinar as sementes. O propósito foi garantir que cargas microbianas externas não o contaminasse e comprometesse as análises. Para tanto, usou-se uma fonte artificial de UV-C com comprimento de onda de 254 nm, ilustrada na Figura 3.2. O tempo de exposição à essa fonte foi mantido de 15 minutos. De acordo com a literatura, a exposição de uma amostra a 15 minutos de radiação UV-C é eficiente para esterilizá-la (GOUVÊA *et al.*, 2014 *apud* ARMAS *et al.*, 2004). Portanto, esse foi o tempo utilizado nesse experimento para a esterilização do sistema.

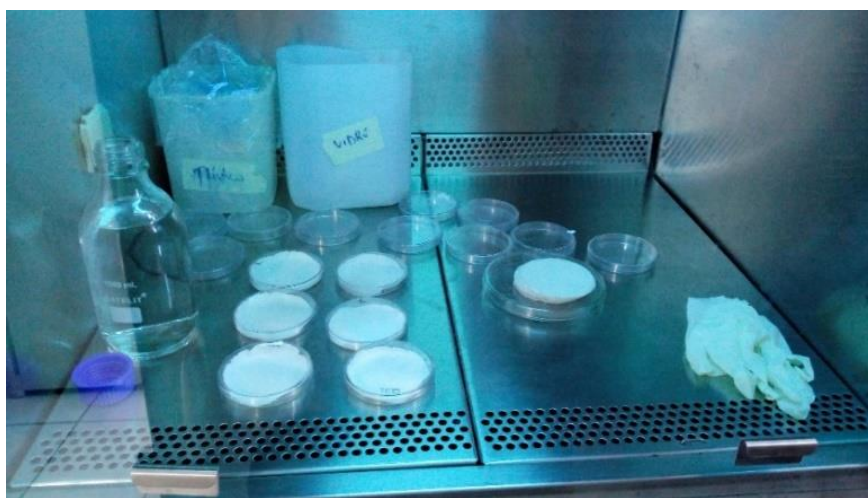


Figura 3.2 – Esterilização por UV-C do sistema utilizado para cultivo dos bioindicadores.

Após a esterilização, a fonte de ultravioleta foi desligada. Devido ao interior da capela ser um ambiente asséptico, o procedimento de montagem das amostras foi realizado ali. Para tanto, foram usadas 36 placas de Petri 90 mm × 90 mm com o fundo recoberto por 2 camadas de papel de filtro de germinação. Logo em seguida, foram gotejados 5 ml de água destilada sobre os papéis que recobriam os fundos das placas. Posteriormente, em 18 dessas placas foram acondicionadas 15 sementes de cebola (*Allium cepa*) em cada uma, e nas outras 18 executou-se o mesmo procedimento, só que com sementes de alface (*Lactuca sativa*). Em 12 placas de cada um dos bioindicadores foram inseridas diferentes concentrações de estéril de urânio (0,25 g, 0,50 g, 0,75 g e 1,00 g). Após isso, todas as placas foram cobertas pelas suas tampas e deslocadas para a bancada do laboratório próxima a uma área com luminosidade natural.

Foram definidos 6 ensaios para cada bioindicador, todos em sistema de triplicata e desenvolvidos sob temperatura ambiente de 22 °C. As amostras dos ensaios E1 (*in natura*) foram cultivadas sob condições naturais. As amostras dos ensaios E2 foram retornadas para a capela para que suas sementes fossem irradiadas por 20 minutos de UV-C e depois colocadas novamente na bancada. O objetivo foi comparar a intensidade de danos (células com micronúcleo), com a dos ensaios E3, E4, E5 e E6, que receberam concentrações de estéril de urânio de 0,25 g; 0,50 g; 0,75 g e 1,00 g, respectivamente.

O período de cultivo foi de 3 dias para as amostras de alface e de 7 dias para as amostras de cebola. Esses são os tempos intrínsecos para germinação e obtenção de raízes de cada uma das espécies e, consequentemente, o tempo em que ficaram expostas ao *background* radioativo desse material. O procedimento descrito é apresentado no diagrama da Figura 3.3.

A investigação foi centrada nas raízes dos ensaios E3, E4, E5 e E6, que foram cultivadas semelhantemente ao ensaio E1 (que não contou com irradiação UV-C das suas sementes), exceto pela exposição às concentrações de estéril de urânio empregadas. Paralelamente, após a obtenção de raízes também foram feitas medidas de FT-IR para ambos os bioindicadores. A finalidade foi verificar possíveis degradações em suas estruturas bioquímicas decorrentes de exposição à radiação ionizante e/ou incorporação de radionuclídeos.

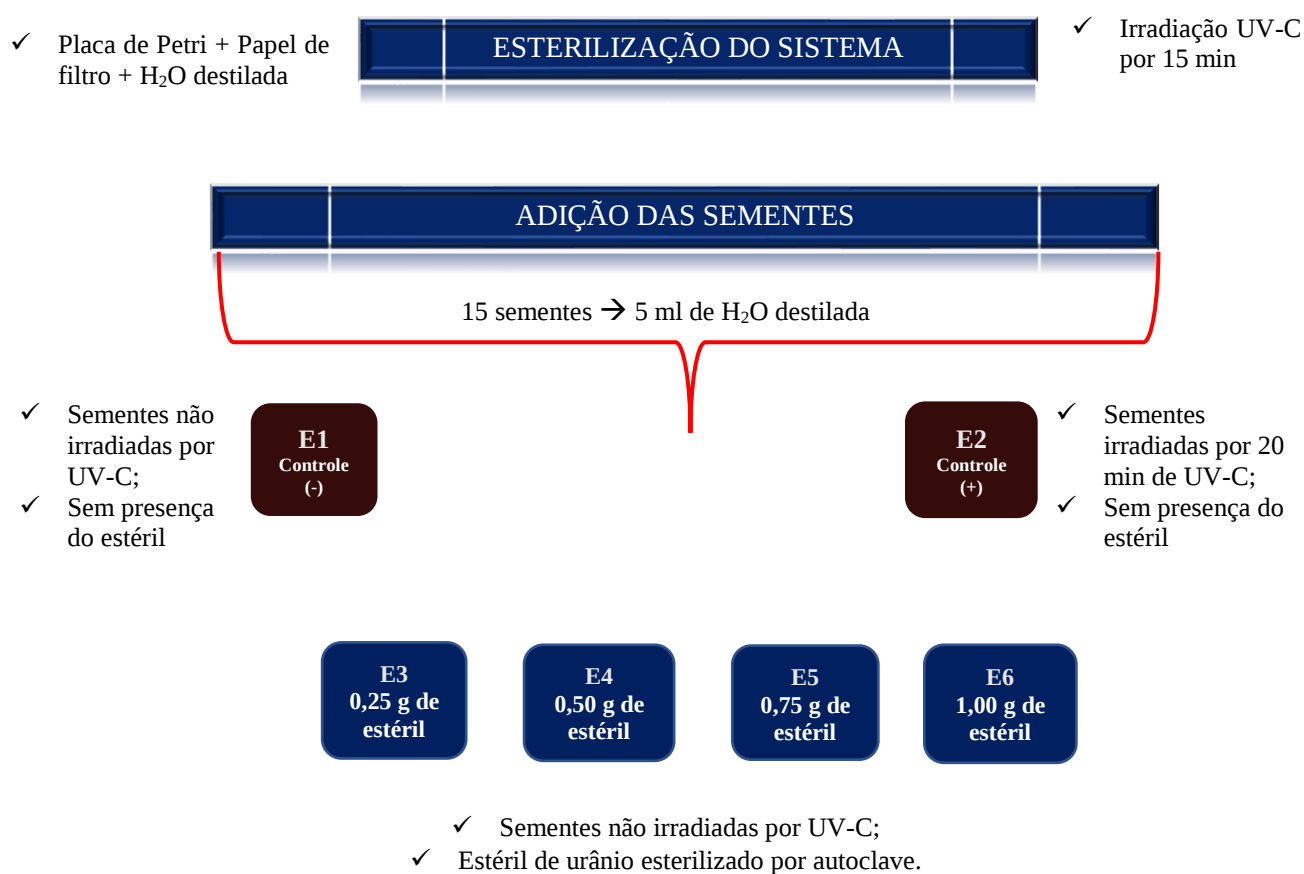


Figura 3.3 – Procedimento para o cultivo dos bioindicadores.

3.2 PROCEDIMENTO E EQUIPAMENTO DE ESPECTROMETRIA GAMA

A amostra de estéril de urânio (rocha em que o minério está ausente ou presente em teores muito baixos para ser aproveitado economicamente) cedida pela INB é mostrada na Figura 3.4.



Figura 3.4 – Amostra de estéril de urânio cedida pela INB.

A sua caracterização radiológica foi realizada no Laboratório de Radiometria Ambiental do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, em São Paulo. Apesar da espectrometria alfa ser o método mais indicado para determinar as atividades do ^{238}U e do ^{232}Th , não tínhamos disponível o equipamento necessário. Por isso, utilizou-se alternativamente a espectrometria gama para estimar as atividades de membros de suas respectivas séries de decaimento. Esses radionuclídeos foram o ^{226}Ra da série do ^{238}U e o ^{228}Ra da série do ^{232}Th . Quando essas espécies estão em equilíbrio radioativo com os seus pais, possuem as mesmas atividades que eles. Em amostras de rocha, como a utilizada neste trabalho, é muito comum ocorrer esse evento, principalmente entre o urânio e o rádio (EISENBUD, GESELL 1997; BONOTO, 2004; SANTOS JÚNIOR, 2005). O ^{40}K teve a sua atividade determinada diretamente por espectrometria gama devido a emitir esse tipo de radiação.

Para as análises por espectrometria gama, uma parte da rocha foi completamente moída, peneirada em malha de 115 mesh e homogeneizada. Foram utilizados $(110,07 \pm 0,01)$ g de amostra em 1 frasco de polietileno de alta densidade (não poroso) selado. A selagem é necessária para evitar o escape do gás radônio e perdas e/ou trocas para o meio externo. Essa

amostra foi armazenada durante o período de 30 dias para atingir o equilíbrio radioativo em relação aos isótopos do rádio.

O equilíbrio radioativo para o ^{226}Ra foi obtido em relação ao ^{214}Pb e ^{214}Bi ($T_{1/2} = 26,8$ min e 19,9 min, respectivamente), enquanto que para o ^{228}Ra foi em relação ao ^{228}Ac ($T_{1/2} = 6,13$ h), ou seja, entre os radionuclídeos de meias-vidas curtas de interesse para a análise. O ^{40}K ($T_{1/2} = 1,27 \cdot 10^9$ a) não possui filhos instáveis, isto faz com que a determinação de sua atividade não necessite desta condição.

Nesta dissertação, após estabelecida a condição de equilíbrio radioativo para o ^{226}Ra e o ^{228}Ra foi considerada a sua extensão para os progenitores de suas séries, ou seja, para o ^{238}U e o ^{232}Th , respectivamente. Isso é possível por se tratar de uma amostra de rocha. Santos Júnior (2005), mostra em seu trabalho a validade dessa consideração, apresentando uma correlação linear que comprovam a situação de equilíbrio radioativo entre o ^{226}Ra e ^{238}U em amostras de rocha.

Como já foi mencionado, os radionuclídeos aqui investigados são os maiores responsáveis por compor os níveis de radioatividade de fundo natural (*background*). A Tabela 3.1 traz as energias dos emissores de radiação gama analisados neste trabalho.

Tabela 3.1 – Principais energias dos emissores gama analisados (Adaptada de KNOLL, 2010).

Radionuclídeo pai	Radionuclídeo filho	Energia (keV)	Intensidade (%)
^{228}Ra ($T_{1/2} = 5,75$ a)	^{228}Ac ($T_{1/2} = 6,13$ h)	911,20	25,8
		968,97	15,8
^{226}Ra ($T_{1/2} = 1600$ a)	^{214}Pb ($T_{1/2} = 26,8$ min)	351,93	35,6
		295,22	18,42
	^{214}Bi ($T_{1/2} = 19,9$ min)	609,32	45,49
		1764,4	15,3
^{40}K ($T_{1/2} = 1,27 \cdot 10^9$ a)	-	1460,82	10,66

Após o período de 30 dias, a amostra foi medida por 150.000 s. A radiação de fundo do detector foi determinada utilizando-se água superpura e o mesmo frasco, geometria e tempo de contagem para as amostras. Essas medidas foram feitas com um detector de HPGe modelo

GX2518 da *Canberra*, com resolução de 1,8 keV em 1,33 MeV (Figura 3.5). Os espectros foram analisados usando o *software* Genie 2000.



Figura 3.5 – Frasco de polietileno (F100) com a amostra (à esquerda) e detector de HPGe (à direita).

O limite de detecção (LID) para os radionuclídeos analisados foi calculado através da medição do frasco de F100 com água superpura por 150.000 s utilizando-se da equação 3.1 proposta por Currie (1968):

$$LID = 4,66 \cdot \frac{\sqrt{B_g}}{E_f \cdot m \cdot t \cdot I_\gamma} \quad (3.1)$$

onde,

LID é o limite de detecção (Bq.kg⁻¹);

B_g é a área líquida da radiação de fundo para a transição gama considerada (contagens);

E_f é a eficiência de contagem para a energia de transição gama considerada (dps⁻¹);

m é a massa da amostra (kg);

t é o tempo de contagem (s);

I_γ é a intensidade absoluta da transição gama considerada;

4,66 é o número associado a confiabilidade da medida (95%).

3.3 PROCEDIMENTO E EQUIPAMENTO DE ESPECTROSCOPIA FT-IR

Após o cultivo, ambos os bioindicadores foram caracterizados estruturalmente através de FT-IR (acrônimo de *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Para essas análises foram utilizadas raízes de aproximadamente 1 cm. O objetivo foi identificar ainda no estágio inicial possíveis alterações em suas estruturas bioquímicas. Além disso, espectros de absorção no infravermelho podem fornecer informações sobre propriedades vibracionais de alterações relacionadas a impurezas incorporadas na matriz de um material e, nesse caso, de radionuclídeos.

As medidas de FT-IR foram realizadas no Laboratório de Arqueometria do Instituto de Física da Universidade de São Paulo. O espectrômetro utilizado foi um modelo portátil Alpha231 da *BRUKER* (Figura 3.6). Os espectros foram registrados à temperatura ambiente de 22 °C, e analisados através do *software* KnowItAll da Bio-Rad.



Figura 3.6 – Espectrômetro de FT-IR (BRUCKER, 2018).

3.4 INSTRUMENTAÇÃO PARA A CONTAGEM DE MICRONÚCLEOS

Para avaliar a indução de células contendo micronúcleos devido a exposição à radiação foram preparadas lâminas de microscopia óptica contendo o material biológico dos bioindicadores. As amostras de alface ficaram expostas 3 dias às concentrações de estéril de

urânio, enquanto que as de cebola ficaram expostas 7 dias. Como já foi dito, esses são os tempos necessários para germinação e obtenção de raízes de cada uma das espécies. A montagem das lâminas é padronizada para esse tipo de estudo e é descrita a seguir.

Após o cultivo, 3 raízes de cada amostra foram coletadas, inseridas em fixador Carnoy (etanol/ ácido acético na proporção 3:1) e armazenadas em tubos de *eppendorf* à temperatura ambiente de 22 °C por 24 horas. Essa etapa é necessária para interromper o processo de divisão celular e, portanto, cessar o desenvolvimento do tecido ainda na fase inicial, preservando a histologia presente (PEREIRA *et al.*, 2015). Decorridas as 24 horas iniciou-se a preparação das lâminas. As raízes foram retiradas do fixador, hidratadas com água destilada e coradas por 20 min com orceína acética 2%. Essa coloração é importante devido a melhorar a qualidade das imagens das células meristemáticas analisadas por microscopia óptica. Após a coloração, as pontas das raízes foram separadas com lâmina de bisturi e cuidadosamente maceradas com um bastão de vidro sobre a lâmina de microscopia, gotejadas com ácido acético 45% para retirar o excesso da orceína, e por fim cobertas com lamínulas. Posteriormente, foi realizada a montagem das lâminas permanentes com Xilol, Bálsamo do Canadá e etellan (Merck).

Após a montagem das lâminas, a avaliação de indução de células com micronúcleos foi feita através de um microscópio óptico da *Leica* via técnica de varredura. A magnitude empregada foi de 400× para as células de cebola e 1.000× para as células de alface. A aplicação de uma maior magnitude para as células de alface deve-se ao tamanho dos seus meristemas.

Pela recomendação da IAEA deve-se analisar 1.000 células por indivíduo, sendo aceitável até 3% de células micronucleadas nesse intervalo. Isso é devido a possibilidade do processo de dano e reparo do DNA também transcorrer por fatores de ordem natural, como por exemplo, para substituir células com curto período de vida (IAEA, 2001). Neste estudo, ambos os bioindicadores contaram com 6 ensaios, cada um montado em sistema de triplicata. Para cada amostra da triplicata coletou-se 3 raízes, sendo analisadas 1.000 células de cada raiz. A média de células analisadas de cada ensaio foi de 3.000 células para cada um. Com base nos resultados obtidos em relação à frequência dos micronúcleos foi efetuada a análise de variância estatística combinada com o teste de Tukey. Esse teste é usado para comparar par a par as médias dos ensaios de um experimento, com o objetivo de verificar em qual(is) ocorre(m) diferenças estatisticamente significativas (PORTALACTION, 2018). Isso foi feito para comparar o grau de danos entre os ensaios e também entre os bioindicadores, a fim de verificar a hipótese de que a evolução dos eventos mutagênicos (células com micronúcleos) ocorria conforme o incremento de baixos níveis de atividade, portanto, sendo mutações radioinduzidas, detectadas através de células de cebola e/ou de alface.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE POR RADIONUCLÍDEO PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ESTÉRIL DE URÂNIO EMPREGADAS NOS ENSAIOS

Apesar da alta concentração de ^{238}U e ^{232}Th em regiões no entorno de minas de urânio, deve-se ter em mente que outros radionuclídeos, inclusive, os provenientes dos decaimentos dessas séries, também se fazem presentes. Então, mesmo que a espectrometria alfa fosse a técnica mais indicada para determinar as atividades do ^{238}U e do ^{232}Th , isso também poderia ser feito indiretamente através de outras técnicas.

Diante disto, optou-se pela espectrometria gama de alta resolução por conta da disponibilidade do equipamento. A aplicação do método para essas medidas é possível devido as séries dos radionuclídeos investigados possuírem membros emissores de radiação gama. Contudo, é necessário estabelecer uma condição de equilíbrio radioativo antes das medições. Essa condição foi estabelecida selando a amostra por 30 dias, a fim de impedir perdas e/ou trocas para o meio externo. Passado esse intervalo de tempo, foram estimadas as atividades dos radionuclídeos ^{226}Ra da série de decaimento do ^{238}U , ^{228}Ra da série de decaimento do ^{232}Th , e o ^{40}K . Esse período foi necessário para se obter o equilíbrio radioativo da amostra entre os isótopos do rádio e os radionuclídeos de meias-vidas curtas. O ^{40}K não possui filhos instáveis e a determinação de sua atividade não depende desta condição.

Cumprе ressaltar, que o rádio possui radioatividade ligeiramente superior que a do urânio, cerca de 3×10^6 vezes maior, porém, a razão Ra/U presente em amostras é de aproximadamente 1 átomo de Ra para 3×10^6 átomos de U, ou seja, isto indica uma tendência ao equilíbrio radioativo (HOLLEMAN, WIBERG, 1960). Entretanto, o rádio possui propriedades geoquímicas que o torna mais suscetível à lixiviação do que o urânio e o tório, o

que causa complicações em se afirmar que tenha sido alcançado o equilíbrio radioativo com os pais de suas séries, pois podem ocorrer perdas significativas ainda no meio ambiente. No entanto, diversos estudos indicam que esse evento é muito raro de ocorrer em amostras de rocha, como a utilizada neste trabalho. Isso se deve ao fato dos radionuclídeos permanecerem imobilizados em sua estrutura, dentro da escala geológica de tempo. Amostras de solos ou sedimentos não possuem esse padrão, pois podem sofrer lixiviação em diferentes graus, conforme o radionuclídeo (EISENBUD, GESELL 1997; BONOTO, 2004). Santos Júnior (2005) mostrou que fazer essa consideração é viável, comprovando mediante uma correlação linear de seus dados, a existência de equilíbrio radioativo entre o ^{226}Ra e o ^{238}U para amostras de rocha e a sua inexistência para amostras de solo.

Em função disto, neste trabalho considerou-se a extensão do equilíbrio radioativo obtido para os isótopos do rádio tanto para o ^{238}U quanto para o ^{232}Th . Assim, a atividade do ^{226}Ra foi considerada como sendo a atividade do pai de sua série, o ^{238}U , bem como a atividade do ^{228}Ra foi considerada a do ^{232}Th . Na Tabela 4.1 são mostrados os valores de concentração de atividade por radionuclídeo da amostra de estéril de urânio obtidos por espectrometria gama.

Tabela 4.1 – Concentração de atividade por radionuclídeo.

MASSA DA AMOSTRA ($\pm 0,00001$) (kg)	CONCENTRAÇÃO DE ATIVIDADE (Bq.kg^{-1})		
	^{40}K	^{226}Ra	^{228}Ra
0,11007	45 ± 4	$1,7 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,6$
Limite de detecção por radionuclídeo	10	1	1

Anjos *et al.* (2011), em um estudo sobre a exposição gama externa proveniente de granitos utilizados para a confecção de pedras ornamentais, concluiu que para esses radionuclídeos as concentrações de atividades variam de 190 Bq.kg^{-1} a 2029 Bq.kg^{-1} para o ^{40}K , de 5 Bq.kg^{-1} a 160 Bq.kg^{-1} para o ^{226}Ra , e de $4,5 \text{ Bq.kg}^{-1}$ a 450 Bq.kg^{-1} para o ^{232}Th . Ao se comparar com os nossos resultados é perceptível que todos os radionuclídeos apresentaram concentrações de atividades muito abaixo desses valores. Desse modo, é possível que a rocha analisada seja um basalto, o que explicaria as baixas atividades presentes (BONOTO, 2004).

Além disso, é importante mencionar que mesmo para uma rocha extraída de um local que apresenta *background* radioativo maior do que localidades consideradas “normais”, os níveis de radioatividade de fundo natural para essa amostra se apresentaram como os que seriam

esperados para qualquer outra região. Entretanto, cabe mencionar que essa amostra se trata de um estéril, ou seja, de uma rocha que não possui urânio suficiente para extração econômica, logo, sendo um caso atípico para aquelas regiões.

Diversos estudos preconizam que baixas atividades provenientes de radionuclídeos não oferecem riscos para exposições externas, porém, indicando também que esse comportamento não é válido para exposições internas crônicas (ARRUDA NETO *et al.*, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2011). Quando há incorporação frequente desses elementos através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados, danos podem ser radioinduzidos e terem efeito cumulativo.

As plantas eucarióticas traduzem efeitos de mutação similares aos que ocorrem no homem. Para uma variedade de agentes, o teste com células meristemáticas de cebola apresenta uma boa concordância com os testes feitos com células de linfócitos periféricos humanos (FISKESJÖ, 1985; PORTIS *et al.*, 2015). No entanto, ainda não há estudos com urânio e nem tão pouco sobre um comparativo entre a radiosensibilidade dessas células. Outro bioindicador que vem tendo destaque é a alface. As células dessa espécie possuem uma sensibilidade elevada, razão pela qual, também foram testadas neste trabalho (BARROS *et al.*, 2002; VALERIO, GARCIA, PEINADO, 2007).

Nesse contexto, sementes de alface e de cebola foram postas para serem germinadas durante o período de 3 e 7 dias, respectivamente, na presença de diferentes concentrações do estéril de urânio. Esse é o tempo necessário para o surgimento de raízes de cada uma dessas espécies e, conseqüentemente, o período em que as suas células ficaram expostas ao *background* radioativo enquanto os seus tecidos biológicos se desenvolviam. As atividades dos radionuclídeos ^{226}Ra , ^{228}Ra e ^{40}K foram estimadas para cada uma das concentrações do material utilizado nos ensaios. Isso foi feito multiplicando-se as concentrações de atividade de cada uma dessas espécies (Tab. 4.1) pelas respectivas massas de estéril usadas. Considerando a função $Z = f(x_1, x_2, x_3, \dots)$, a propagação de incertezas associadas a esses valores foi calculada mediante a equação (4.1).

$$\sigma_Z = \sqrt{\left(\frac{\partial Z}{\partial x_1} \sigma_{x_1}\right)^2 + \left(\frac{\partial Z}{\partial x_2} \sigma_{x_2}\right)^2 + \left(\frac{\partial Z}{\partial x_3} \sigma_{x_3}\right)^2 + \dots} = \sqrt{\sum_i \left(\frac{\partial Z}{\partial x_i} \sigma_{x_i}\right)^2} \quad (4.1)$$

Os valores estimados de atividade para esses radionuclídeos são mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Estimativa da atividade por radionuclídeo para as concentrações de estéril de urânio utilizadas nos ensaios.

MASSA DA AMOSTRA ($\pm 0,01$) $\times 10^{-3}$ (kg)	ATIVIDADE (Bq) $\times 10^{-3}$		
	^{40}K	^{226}Ra ($\pm 0,017$)	^{228}Ra ($\pm 0,03$)
0,25	$11,25 \pm 0,45$	0,425	0,65
0,50	$22,50 \pm 0,45$	0,850	1,30
0,75	$33,75 \pm 0,46$	1,275	1,95
1,00	$45,00 \pm 0,47$	1,700	2,60

4.2 ESPECTROS DE FT-IR

Alterações genéticas estão associadas às perturbações do metabolismo, que se traduzem através de modificações dos componentes moleculares de células e de tecidos. O potencial clínico dos espectros de infravermelho com transformada de Fourier para detectar essas mudanças e o seu uso como uma ferramenta de diagnóstico é algo que tem se mostrado promissor (AMENABAR *et al.*, 2013; SILVA, 2013).

Nesse contexto, a caracterização estrutural se fez importante para detectar a presença de qualquer composto inserido na matriz dos bioindicadores e/ou de possíveis degradações decorrentes de exposição à radiação ionizante. Ambos os parâmetros podem ser facilmente identificados através de bandas e/ou picos de absorção, que ao serem emitidos geram padrões espectrais característicos para a espécie analisada. Isso acontece devido a interação da radiação infravermelha com os modos vibracionais das ligações químicas do material.

A Figura 4.1 mostra a estrutura química de alguns compostos presentes na alface (*Lactuca sativa*).

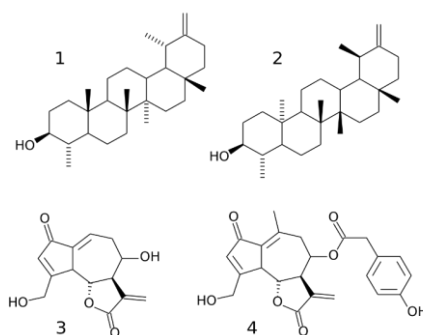


Figura 4.1 – Compostos químicos que ocorrem na alface: (1) α -lactucol (taraxasterol); (2) β -lactucol (lactucon, lactucerin); (3) lactucina; (4) lactucopicrin (WIKIPÉDIA, 2018).

Diante disto, foram feitas medidas de FT-IR das amostras de raízes de alface para identificar possíveis degradações radioinduzidas em sua estrutura bioquímica, ou ainda, a incorporação de algum composto estranho à sua matriz. Um comparativo entre o ensaio *in natura* e os submetidos às concentrações de estéril de urânio é mostrado na Figura 4.2. Esses espectros foram deslocados para melhor visualização das bandas e/ou picos. Os espectros individuais e com a escala de transmitância normalizada são mostrados na Figura 4.3.

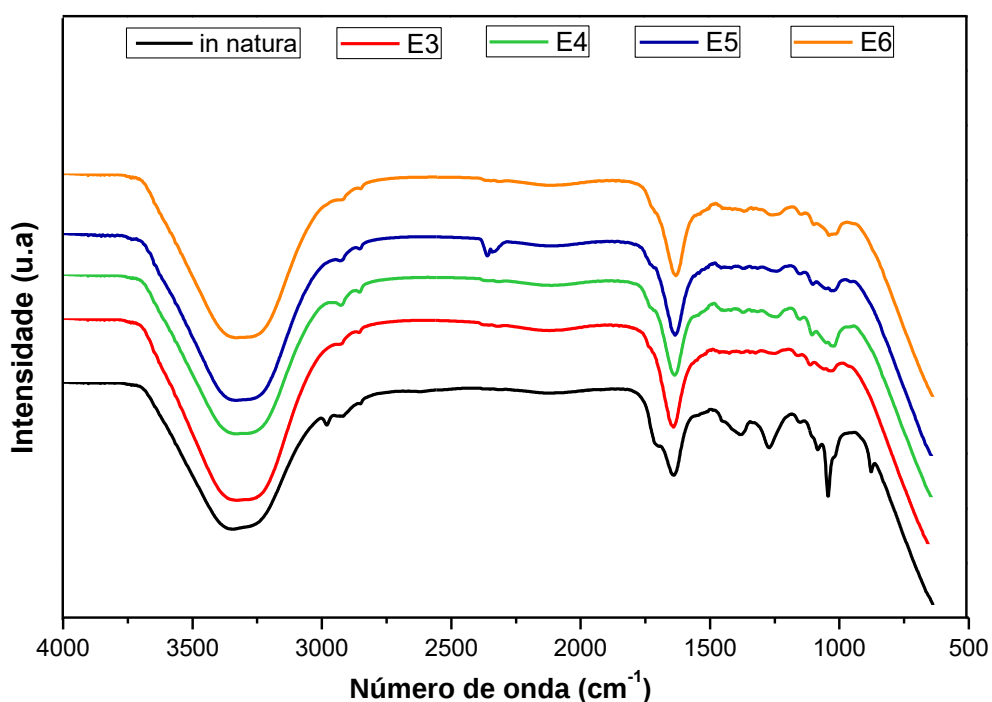


Figura 4.2 – Comparativo do espectro de FT-IR do ensaio *in natura* de alface com os demais ensaios.

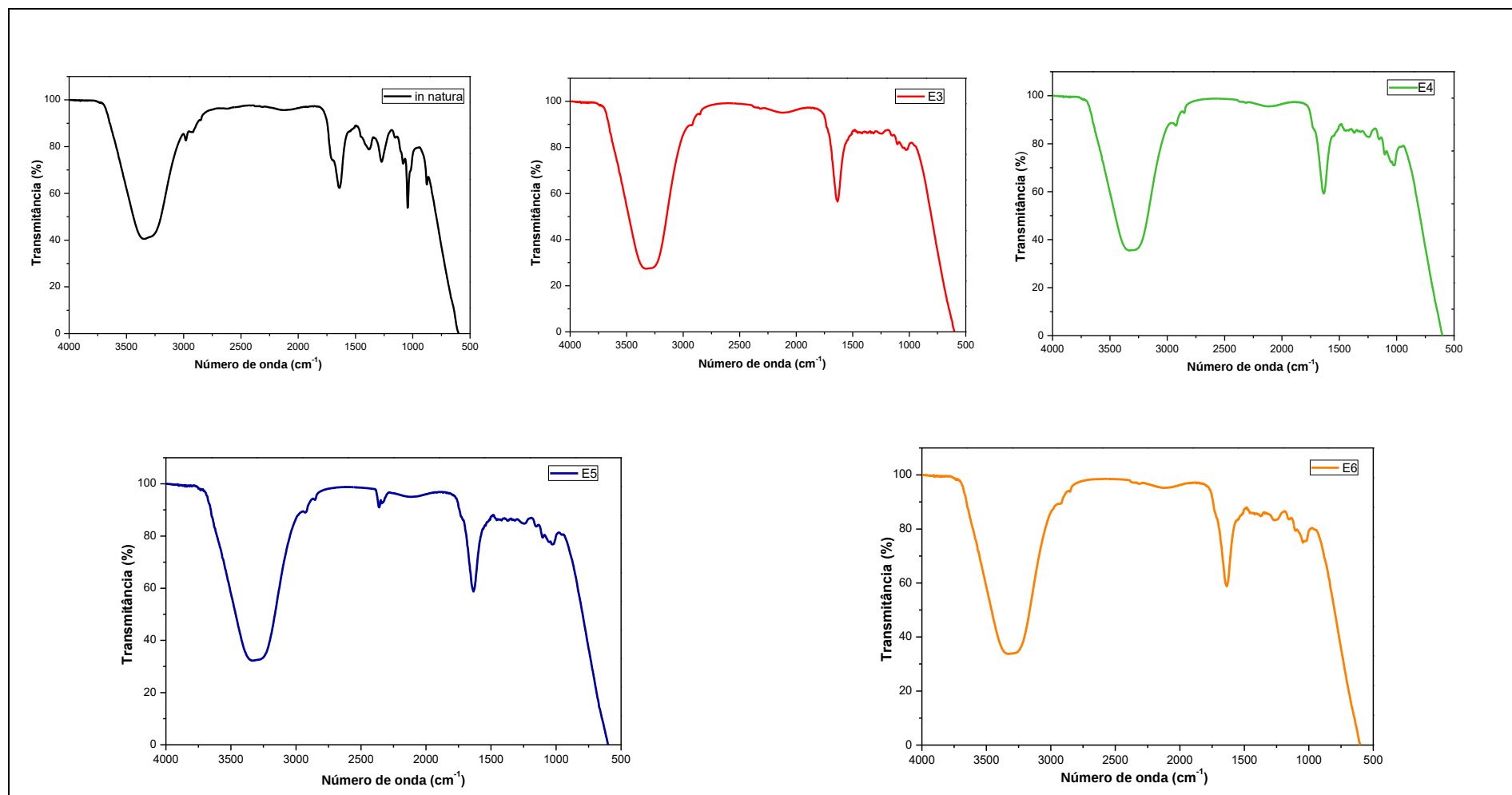


Figura 4.3 – Espectros de FT-IR dos ensaios E1, E3, E4, E5 e E6 com alface submetidos às concentrações de 0,00 g; 0,25 g; 0,50 g; 0,75g e 1,00 g de estéril de urânio, respectivamente.

A interpretação das bandas e picos presentes nos espectros foi feita através de tabelas de modos vibracionais e com o auxílio do *software* KnowItAll da Bio-Rad. O espectro tomado como referência foi o do ensaio E1 (*in natura*), pois este ensaio foi desenvolvido sob condições naturais.

A alface é composta por aproximadamente 96% de água e o seu espectro de infravermelho pode confirmar isso. As bandas características para esse elemento estão presentes em cerca de 3440 cm^{-1} e em 1645 cm^{-1} , respectivamente (PETERSON, 1972).

As bandas entre 1800 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} são referentes aos compostos fenólicos, estruturas muito presentes em plantas, inclusive na alface e cebola. Por exemplo, a banda característica de 1630 cm^{-1} é referente ao estiramento C – C do anel fenólico (SCHULZ, BARANSKA, 2007), a banda referente ao 1559 cm^{-1} é referente à base do anel (DOVBESHKO, GRIDINA, KRUGLOBA, PASHCUCK, 1997).

Na amostra *in natura*, a banda de “ombro” próxima à 1720 cm^{-1} indica ligações C=O. A região entre 1350 cm^{-1} a 1310 cm^{-1} corresponde a compostos de enxofre, principalmente, sulfona (SO_2). O pico em 1030 cm^{-1} e 965 cm^{-1} é um indicativo da presença do grupo fosfato (PO_4^{-3}) (PETERSON, 1972). Esses dados concordam com as análises feitas através do *software* KnowItAll.

Ao se comparar o espectro da amostra E1 com os espectros das amostras expostas à diferentes concentrações de estéril de urânio (Fig. 4.2), nota-se que houve redução nos modos vibracionais para todos os ensaios que tiveram esse material presente. Esse comportamento é muito acentuado entre as bandas de 1495 cm^{-1} a 930 cm^{-1} desses ensaios, região que contava com compostos de enxofre (S) e de fósforo (P).

Como já foi mencionado, quando a radiação interage com o tecido biológico há um desencadeamento de processos. No primeiro momento, que tem curta duração, são produzidas ionizações e excitações dos átomos. Logo após isso, se transcorre o estágio físico-químico, também de curta duração, promovendo rompimento de ligações químicas das moléculas e formação de radicais livres. O terceiro estágio dura poucos segundos e é responsável pela fase em que são danificadas importantes moléculas, inclusive a de DNA. Isso se deve a formação de radicais livres da etapa anterior.

A amostra de estéril empregada no experimento é uma rocha que contém urânio natural. Na natureza, o urânio é encontrado associado a óxidos (U–O), sendo o mais comum o UO_2 , que é insolúvel em água. Porém, a ação oxidativa que sofre em meio aquoso é capaz

de mudar a sua valência de 4+ para 6+, tendo como consequência o surgimento do íon uranila (UO_2^+). Essa espécie, além de possuir alta toxicidade, conta com uma mobilidade elevada e, devido a afinidade para se coordenar com íons do tipo CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} e NO_3^- , por exemplo, formam compostos solúveis em água (BONOTO, 2004).

Assim, é provável que após os eventos desencadeados por radiação, que culminaram em quebras de ligações de compostos associados ao enxofre e ao fósforo, houve captura dessas espécies pelo íon uranila. É interessante notar que danos similares podem vir a ocorrer na estrutura do DNA, uma vez que as suas cadeias também possuem o grupo fosfato ligando-se aos nucleotídeos. Caso isso ocorra, a molécula se desestabiliza e pode gerar erros genéticos grosseiros.

No ensaio E5, submetido à concentração de 0,75 g de estéril de urânio, uma banda entre 2400 cm^{-1} e 2200 cm^{-1} se demonstrou ativa. De acordo com a literatura, isso pode estar associado a presença do íon amônio NH_4^+ (PETERSON, 1972). Já as análises feitas pelo *software* KnowItAll, também indicaram a possibilidade de compostos de fósforo. Minérios de urânio são muito comuns ocorrerem associados ao grupo fosfato, como por exemplo, em Santa Quitéria, no Estado do Ceará. Logo, a presença desta banda pode estar associada a própria composição da amostra de estéril usada, sendo necessário verificar em estudos futuros além de sua caracterização radiológica, a sua composição química.

Acredita-se que não tenha havido incorporação de urânio pelas raízes de alface. As bandas características para compostos desse elemento ativas no FT-IR são apresentadas na Tabela 4.3. Como pode ser visto nos espectros de todos os ensaios para esse bioindicador (Fig. 4.2 e Fig. 4.3), não há a presença dessas referidas bandas.

Tabela 4.3 – Bandas associadas ao composto de UO_2 (Adaptada de MACHADO, FAÊDA, LAMEIRAS, 2010).

Banda (cm^{-1})	Atribuída a
624	$\text{UO}_{2+x>0,142}$ UO_3
673	U_3O_7 e U_3O_8 U_3O_8
708	UO_3
842	UO_3
897	U_3O_8 e UO_3
910	U_3O_8 e UO_3
943	U_3O_8 e UO_3

Sabe-se que a atividade de 1 g de urânio natural corresponde a $0,68 \mu\text{Ci}$ ($2,516 \times 10^4 \text{ Bq}$) (ATSDR, 2013). Neste trabalho, devido a considerarmos a condição de equilíbrio radioativo entre o ^{226}Ra e o ^{238}U nas amostras de rocha, realizamos uma estimativa dos teores de urânio presentes nas concentrações de estéril usadas nos ensaios. Isso foi feito a partir de uma regra de 3 simples e usando as atividades obtidas para o ^{226}Ra (Tab. 4.2), consideradas como sendo as atividades do ^{238}U . Assim, os valores encontrados para o elemento foram de aproximadamente $0,02 \mu\text{g}$ para 0,25 g de estéril; de $0,03 \mu\text{g}$ para 0,50 g de estéril; de $0,05 \mu\text{g}$ para 0,75 g de estéril, e de $0,07 \mu\text{g}$ para 1,00 g estéril. Esses baixos valores representam mais um indicativo de que não houve incorporação de urânio. O ^{232}Th é uma espécie ainda mais insolúvel em água que o urânio. Para plantas, a probabilidade de incorporação é quase inexistente, razão pela qual a sua concentração em materiais biológicos é insignificante (TONETTO; BONOTO, 2002).

É importante ressaltar, que embora a caracterização radiológica tenha sido feita em função das atividades do ^{226}Ra e ^{228}Ra – membros das séries de decaimento do ^{238}U e ^{232}Th , respectivamente, não foram verificadas as possibilidades de incorporação dos isótopos do rádio pelas amostras. No entanto, devido as suas baixíssimas concentrações de atividades (Tab. 4.1),

muito inferiores aos níveis encontrados em solos de baixo *background* radioativo, situados entre 20 e 40 Bq/kg, aproximadamente, acredita-se que essas espécies não tenham sido incorporadas à estrutura bioquímica da alface (EISENBUD, GESELL 1997; BONOTO, 2004).

O potássio, por sua vez, apesar de na maioria dos solos se apresentar em altos níveis, a disponibilidade para plantas é baixa devido à grande porcentagem estar na forma insolúvel. Porém, a sua incorporação pode acontecer através da troca de íons positivos na dissolução do solo. Sendo um nutriente essencial tanto para plantas quanto para humanos, geralmente se encontra em equilíbrio com o seu isótopo radioativo, o ^{40}K . Essa espécie possui abundância relativa de 0,0119%. Em solos de baixa radioatividade de fundo (*background*), os seus níveis de concentração de atividade ficam em torno de 100 a 600 Bq/kg (EISENBUD, GESELL, 1997), novamente muito inferiores aos valores obtidos neste trabalho (Tab. 4.1). Estima-se que no corpo do homem referência (70 kg) exista 140 g de potássio, sendo a atividade responsável pelo ^{40}K de 3×10^3 Bq. Este isótopo contribui com o equivalente de dose de 0,17 mSv para crianças e de 0,19 mSv para adultos, cuja maior contribuição é dada pela emissão β^- (UNSCEAR, 2000).

Para as amostras de raízes de cebola também foi realizado um comparativo entre o espectro de FT-IR do ensaio *in natura* com os espectros dos ensaios submetidos às diferentes concentrações de estéril de urânio, que estão deslocados para melhor visualização de bandas/picos (Fig. 4.5). Esses espectros são novamente apresentados, porém, individualmente e com a escala de transmitância normalizada na Figura 4.6.

A estrutura química de alguns compostos químicos presentes na cebola é mostrada na Figura 4.4.

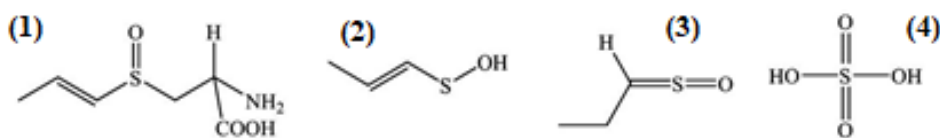


Figura 4.4 – Compostos químicos que acontecem na cebola: (1) 1-propenil-L-cisteína sulfóxido, (2) ácido 1 – propenilsulfênico, (3) óxido de tiopropionaldeído e (4) ácido sulfúrico (WIKIPÉDIA, 2018).

Assim como foi feito para as amostras de alface, a interpretação das bandas e picos presentes nos espectros de cebola foi verificada através de tabelas de modos vibracionais e com

o auxílio do *software* KnowItAll da Bio-Rad. O espectro tomado como referência foi o do ensaio E1 (*in natura*), pois este ensaio foi desenvolvido sob condições naturais.

A cebola é composta por aproximadamente 89 a 95% de água e o seu espectro de infravermelho pode confirmar isso. As bandas características para esse elemento estão presentes em cerca de 3440 cm^{-1} e em 1645 cm^{-1} , respectivamente (PETERSON, 1972).

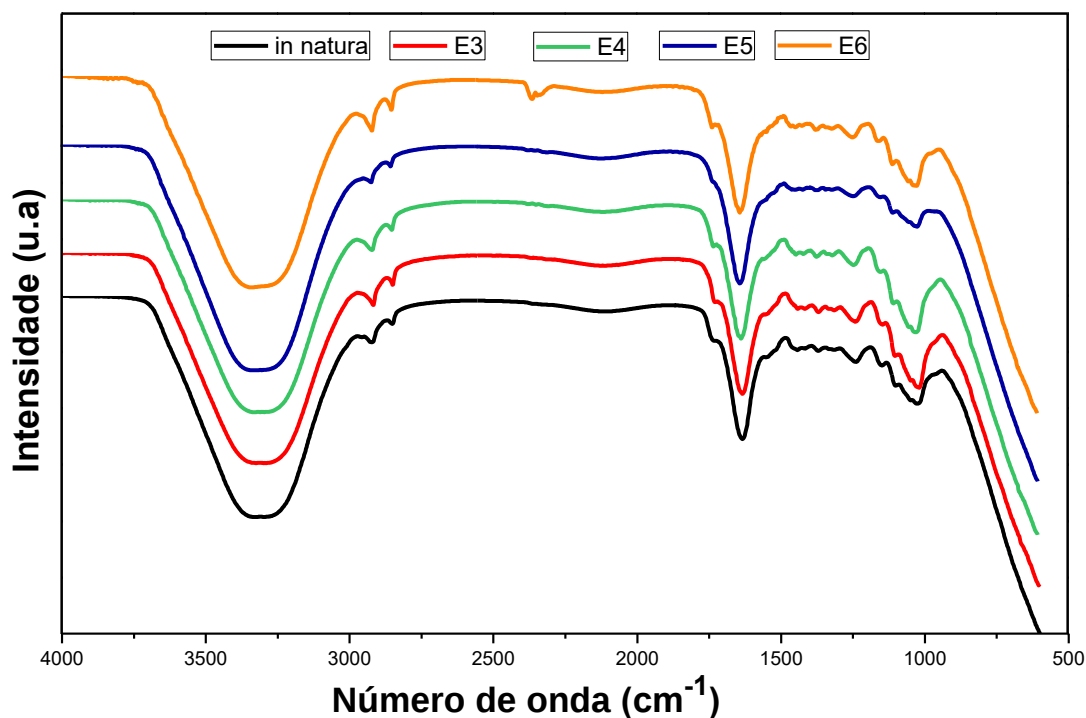


Figura 4.5 – Comparativo do espectro de FT-IR do ensaio *in natura* de cebola com os demais ensaios.

Os espectros de FT-IR para as raízes desse bioindicador que foram germinadas na presença de estéril de urânio apresentaram variações discretas em relação ao espectro do ensaio E1 (*in natura*). Mesmo assim, é possível perceber diferenças entre essas alterações, como por exemplo, as situadas na região entre 3000 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} . Absorções nessa região indicam rupturas de cadeias aromáticas (PETERSON, 1972).

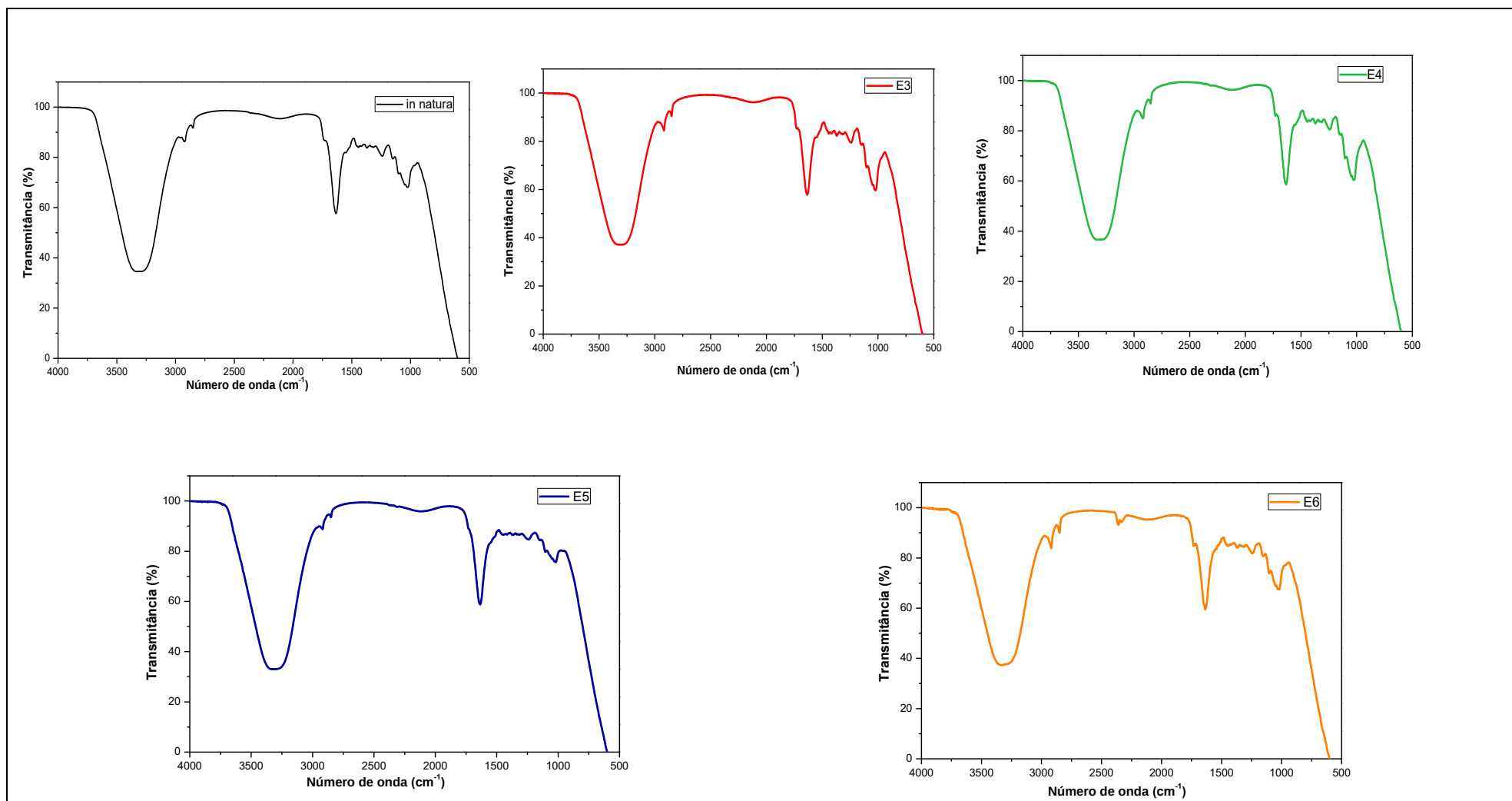


Figura 4.6– Espectros de FT-IR dos ensaios E1, E3, E4, E5 e E6 com cebola submetidos às concentrações de 0,00 g, 0,25 g, 0,50 g, 0,75g e 1,00 g de estéril de urânio, respectivamente.

Essa análise concorda com os dados extraídos do *software* KnowItAll da Bio-Rad. Embora essas bandas também estejam presentes no espectro do ensaio E1, como já foi dito, o mecanismo de dano e reparo da molécula de DNA transcorre naturalmente para eliminar “imperfeições”, como células de curto período de vida. No entanto, deve-se notar que as intensidades dessas bandas sofrem variação entre os ensaios com estéril de urânio, indicando que, em relação ao ensaio *in natura*, a exposição aos diferentes *backgrounds* induziu um número maior de quebras.

A região entre 1350 cm^{-1} a 1310 cm^{-1} correspondente aos compostos de enxofre, e os picos em 1030 cm^{-1} e 965 cm^{-1} , relacionados ao grupo fosfato, também se mostraram presentes para essas amostras. Porém, as degradações ocorridas nessas regiões foram menos intensas do que as observadas nos ensaios com alface. A maior degradação observada aconteceu no ensaio E5. Isso pode ter ocorrido devido a uma concentração mais localizada de íons uranila (UO_2^+), que foi capaz de remover mais efetivamente esses nutrientes das raízes.

O ensaio E6 também apresentou a mesma banda que o ensaio E5 com alface, em torno de 2400 cm^{-1} e 2200 cm^{-1} . Como relatado anteriormente, isso pode indicar a presença tanto do íon amônio (NH_4^+) quanto de compostos de fósforo. Porém, acredita-se que a última possibilidade seja a mais provável devido a ser muito comum a ocorrência de minérios de urânio associados ao grupo fosfato.

Assim como nos espectros das amostras de alface, também não foram observadas para as raízes de cebola bandas ativas no FT-IR para compostos de urânio. Diante disto, pelos mesmos fatores já discutidos, acredita-se que também não houve incorporação dos radionuclídeos investigados para esse bioindicador.

4.3 MICRONÚCLEOS RADIOINDUZIDOS

A escolha de raízes de cebola e de alface para serem germinadas na presença de estéril de urânio justificou-se pela sensibilidade que suas células apresentam a uma infinidade de agentes agressores. Em especial, células de cebola são consideradas como um bioindicador universal, pois reportam uma concordância de 71% a 91,5% com os testes realizados com células de mamíferos (GRANT, 1978; GRANT, 1982; GROVER *et al.*, 1990). No que se refere ao homem, conservam um bom grau de concordância dos efeitos genotóxicos observados em linfócitos periféricos humanos (FISKESJÖ, 1985; PORTIS *et al.*, 2015). A alface, por sua vez, apresenta-se como um bioindicador em ascensão, pois tem demonstrado uma sensibilidade muito elevada quando exposta a diversas substâncias (BARROS *et al.*, 2002; VALERIO, GARCIA, PEINADO, 2007).

Tendo em vista as especulações sobre a alta incidência de casos de câncer nas regiões de Caetité e Lagoa Real, buscou-se verificar, através desses bioindicadores vegetais, possíveis riscos ocasionados pela exposição crônica a radionuclídeos naturais. O sistema teste com plantas é considerado o mais adequado para detecção de genotoxicidade, pois permite avaliar níveis de impacto ambiental, traduzindo-os sob forma de alerta de riscos diretos e indiretos para o homem (EL SHAHABY *et al.*, 2003).

A avaliação de efeitos radioinduzidos foi feita através da técnica do micronúcleo, que é um dos métodos recomendados pela Agência Internacional de Energia Atômica para essas situações. Segundo a recomendação, devem ser analisadas 1.000 células por indivíduo, sendo considerados como eventos normais até 3% de células com micronúcleos (IAEA, 2001). Nesta dissertação, para ambos os bioindicadores, foram montados 6 ensaios, todos em triplicata. Para cada ensaio foram analisadas em média 3.000 células. A Figura 4.7 mostra as etapas do procedimento executado tanto para os ensaios com alface (*Lactuca sativa*) quanto para os ensaios com cebola (*Allium cepa*).

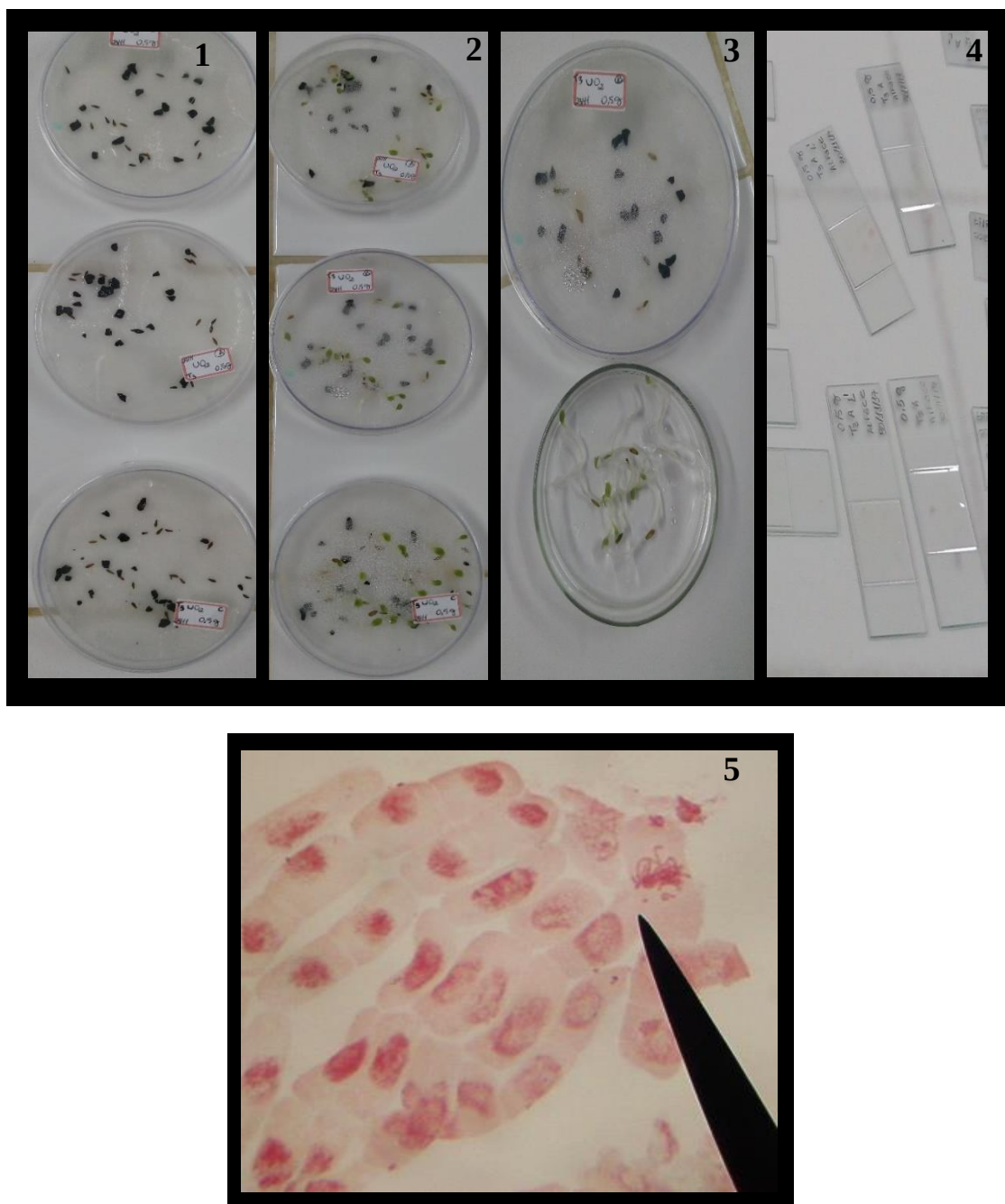


Figura 4.7 – Procedimento para avaliação de micronúcleos radioinduzidos nas células dos bioindicadores – (1) Sementes postas para germinar, (2) Crescimento de raízes, (3) Coleta das raízes, (4) Confeção de lâminas p/ microscopia óptica, (5) Contagem de células saudáveis e com micronúcleos.

As médias e o desvio padrão (d. p.) de células com micronúcleos por ensaio para cada bioindicador são apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5.

Tabela 4.4 – Influência da variação do *background* radioativo na frequência de micronúcleos (MN) induzidos em células de alface (*Lactuca sativa*) como bioindicador.

Grupo	Amostra	Massa de estéril ($\pm 0,01$) $\times 10^{-3}$ (kg)	Estimativa da atividade por radionuclídeo (Bq) $\times 10^{-3}$			Número de células analisadas	Número de células com MN	Frequência do evento (MN/Célula)
			^{40}K	^{226}Ra ($\pm 0,017$)	^{228}Ra ($\pm 0,03$)			
A ₁	E1 (<i>in natura</i>)	0,00	-	-	-	3.000	48	0,016
	E2 (UV-C)	0,00	-	-	-	3.000	216	0,072
	E3	0,25	11,25 $\pm$ 0,45	0,425	0,65	3.000	161	0,054
	E4	0,50	22,50 $\pm$ 0,45	0,850	1,30	3.000	165	0,055
	E5	0,75	33,75 $\pm$ 0,46	1,275	1,95	3.000	370	0,123
	E6	1,00	45,00 $\pm$ 0,47	1,700	2,60	3.000	978	0,326
A ₂	E1 (<i>in natura</i>)	0,00	-	-	-	3.000	35	0,012
	E2 (UV-C)	0,00	-	-	-	3.000	222	0,074
	E3	0,25	11,25 $\pm$ 0,45	0,425	0,65	3.000	192	0,064
	E4	0,50	22,50 $\pm$ 0,45	0,850	1,30	3.000	185	0,062
	E5	0,75	33,75 $\pm$ 0,46	1,275	1,95	3.000	395	0,132
	E6	1,00	45,00 $\pm$ 0,47	1,700	2,60	3.000	938	0,313
A ₃	E1 (<i>in natura</i>)	0,00	-	-	-	3.000	41	0,014
	E2 (UV-C)	0,00	-	-	-	3.000	220	0,073
	E3	0,25	11,25 $\pm$ 0,45	0,425	0,65	3.000	177	0,059
	E4	0,50	22,50 $\pm$ 0,45	0,850	1,30	3.000	176	0,059
	E5	0,75	33,75 $\pm$ 0,46	1,275	1,95	3.000	383	0,128
	E6	1,00	45,00 $\pm$ 0,47	1,700	2,60	3.000	958	0,319
(Média $\pm$ d. p.)	E1 (<i>in natura</i>)	0,00	-	-	-	3.000	(41 $\pm$ 7)	(0,014 $\pm$ 0,002)
	E2 (UV-C)	0,00	-	-	-	3.000	(219 $\pm$ 3)	(0,073 $\pm$ 0,001)
	E3	0,25	11,25 $\pm$ 0,45	0,425	0,65	3.000	(177 $\pm$ 15)	(0,059 $\pm$ 0,005)
	E4	0,50	22,50 $\pm$ 0,45	0,850	1,30	3.000	(175 $\pm$ 10)	(0,059 $\pm$ 0,004)
	E5	0,75	33,75 $\pm$ 0,46	1,275	1,95	3.000	(383 $\pm$ 12)	(0,128 $\pm$ 0,005)
	E6	1,00	45,00 $\pm$ 0,47	1,700	2,60	3.000	(958 $\pm$ 20)	(0,319 $\pm$ 0,007)

Tabela 4.5 – Influência da variação do *background* radioativo na frequência de micronúcleos (MN) induzidos em células de cebola (*Allium cepa*) como bioindicador.

Grupo	Amostra	Massa de estéril ($\pm 0,01$) $\times 10^{-3}$ (kg)	Estimativa da atividade por radionuclídeo (Bq) $\times 10^{-3}$			Número de células analisadas	Número de células com MN	Frequência do evento (MN/Célula)
			^{40}K	^{226}Ra ($\pm 0,017$)	^{228}Ra ($\pm 0,03$)			
C ₁	E1 (<i>in natura</i>)	0,00	-	-	-	3.000	11	0,004
	E2 (UV-C)	0,00	-	-	-	3.000	184	0,061
	E3	0,25	$11,25 \pm 0,45$	0,425	0,65	3.000	263	0,088
	E4	0,50	$22,50 \pm 0,45$	0,850	1,30	3.000	327	0,109
	E5	0,75	$33,75 \pm 0,46$	1,275	1,95	3.000	345	0,115
	E6	1,00	$45,00 \pm 0,47$	1,700	2,60	3.000	459	0,153
C ₂	E1 (<i>in natura</i>)	0,00	-	-	-	3.000	17	0,006
	E2 (UV-C)	0,00	-	-	-	3.000	193	0,064
	E3	0,25	$11,25 \pm 0,45$	0,425	0,65	3.000	281	0,094
	E4	0,50	$22,50 \pm 0,45$	0,850	1,30	3.000	323	0,108
	E5	0,75	$33,75 \pm 0,46$	1,275	1,95	3.000	397	0,132
	E6	1,00	$45,00 \pm 0,47$	1,700	2,60	3.000	484	0,161
C ₃	E1 (<i>in natura</i>)	0,00	-	-	-	3.000	15	0,005
	E2 (UV-C)	0,00	-	-	-	3.000	186	0,062
	E3	0,25	$11,25 \pm 0,45$	0,425	0,65	3.000	274	0,091
	E4	0,50	$22,50 \pm 0,45$	0,850	1,30	3.000	318	0,106
	E5	0,75	$33,75 \pm 0,46$	1,275	1,95	3.000	368	0,123
	E6	1,00	$45,00 \pm 0,47$	1,700	2,60	3.000	453	0,151
(Média $\pm$ d. p.)	E1 (<i>in natura</i>)	0,00	-	-	-	3.000	(14 $\pm$ 3)	(0,005 $\pm$ 0,001)
	E2 (UV-C)	0,00	-	-	-	3.000	(188 $\pm$ 5)	(0,062 $\pm$ 0,002)
	E3	0,25	$11,25 \pm 0,45$	0,425	0,65	3.000	(273 $\pm$ 9)	(0,091 $\pm$ 0,003)
	E4	0,50	$22,50 \pm 0,45$	0,850	1,30	3.000	(323 $\pm$ 4)	(0,108 $\pm$ 0,002)
	E5	0,75	$33,75 \pm 0,46$	1,275	1,95	3.000	(370 $\pm$ 26)	(0,123 $\pm$ 0,009)
	E6	1,00	$45,00 \pm 0,47$	1,700	2,60	3.000	(465 $\pm$ 16)	(0,155 $\pm$ 0,005)

4.3.1 INFLUÊNCIA DO *background* RADIOATIVO NAS AMOSTRAS DE ALFACE

Os dados sobre a influência da variação do *background* radioativo no surgimento de células com micronúcleos dos ensaios com alface (*Lactuca sativa*) são mostrados na Tabela 4.5. A partir desses valores, foi montado um histograma das médias de células com micronúcleos (MN) por ensaio, que é apresentado na Figura 4.8.

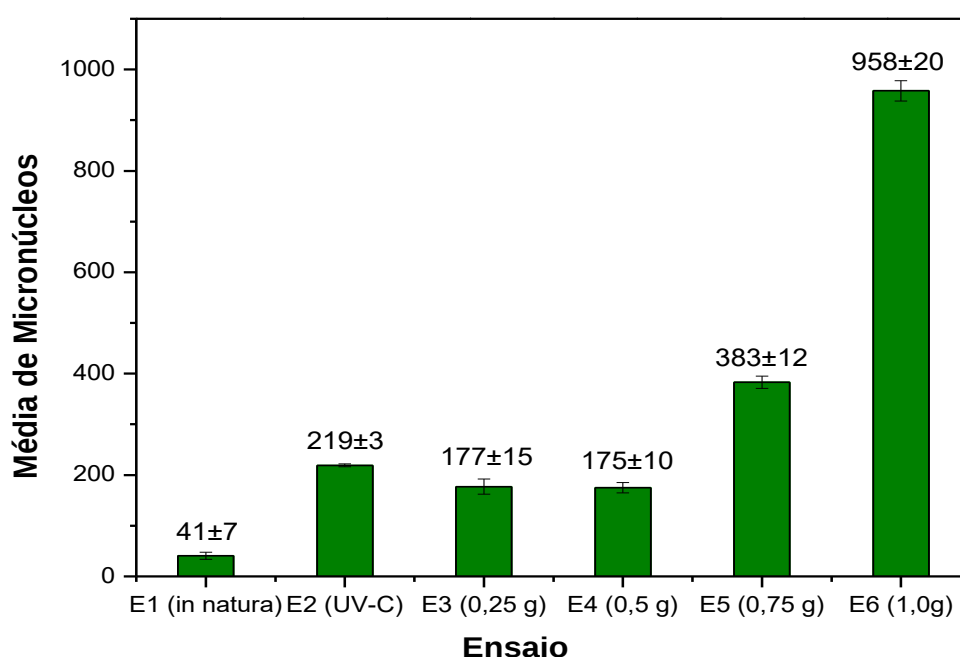


Figura 4.8 – Média de células com micronúcleos nos ensaios com alface (*Lactuca sativa*).

Analisando-se o histograma para os ensaios com alface (Fig. 4.8), o ensaio E1, que foi desenvolvido sob condições naturais, apresentou, em uma média de 3.000 células analisadas, 41 ± 7 células com micronúcleos. Em porcentagem isso representou $(1,4 \pm 0,2)\%$ de danos, portanto, estando abaixo do valor de 3% de eventos de dano e reparo do DNA que acontecem por fatores de ordem natural (IAEA, 2001).

No ensaio E2, antes de serem postas para germinar, as sementes de alface foram expostas durante 20 minutos à uma fonte artificial de ultravioleta, cujo comprimento de onda é de 254 nm. Quando esse tipo de radiação interage com a molécula de DNA promove excitação de elétrons do anel duplo de timina. Logo em seguida há a formação de ligações covalentes entre bases adjacentes. O dímero de timina bloqueia a duplicação de DNA na região, e pode assim induzir mutações. Além disso, radiações UV com comprimento de onda de 253,7 nm

podem quebrar ligações O-H, C-C, C-H, H-N e S-S (COUTINHO *et al.*, 2003). Portanto, a irradiação com UV-C no ensaio E2 foi proposital e serviu como parâmetro para comparar, através do teste de micronúcleo, as intensidades de danos celulares radioinduzidos nos demais ensaios.

Nesse sentido, em uma média de 3.000 células analisadas para o ensaio E2, foram observadas 219 ± 3 células com micronúcleos. Em porcentagem isso representou $(7,3 \pm 0,1)\%$ de danos gerados. Como já era de se esperar, houve efeitos induzidos devido a essa exposição, sendo estes de aproximadamente 4% a mais em relação ao valor de referência para células não irradiadas da IAEA e de 6% em relação ao ensaio E1.

Ao se comparar os ensaios E3 a E6, que foram desenvolvidos sob a influência de 0,25 g; 0,50 g; 0,75 g e 1,00 g de estéril de urânio, respectivamente, nota-se um comportamento irregular para a indução de danos. Isso provavelmente está associado às intensidades de exposição que sofrem influência tanto da variação de atividade quanto do tempo de exposição. O tempo de exposição foi de 3 dias para todos os ensaios com alface, pois esse é o período necessário para germinação de sementes e obtenção das raízes dessa espécie. Portanto, o comportamento diferente observado entre os ensaios com estéril para esse bioindicador foi devido às variações de intensidade de exposição causadas pela mudança de concentração do material e, consequentemente, das atividades associadas aos radionuclídeos investigados.

Os ensaios E3 e E4 apresentaram em uma média de 3.000 células analisadas de cada um, 177 ± 15 e 175 ± 10 células com micronúcleos, respectivamente. Em porcentagem, isso correspondeu a $(5,9 \pm 0,5)\%$ de danos gerados para o ensaio E3 e a $(5,9 \pm 0,4)\%$ para o ensaio E4. Sendo assim, ambos mantiveram praticamente igual o grau de incidência de danos radioinduzidos, excedendo o limite de referência em aproximadamente 3% e apresentando um acréscimo de 4,5% em relação ao ensaio E1.

Para o ensaio E5 também foram contabilizadas uma média de 3.000 células, sendo observadas 383 ± 12 células com micronúcleos. Em porcentagem isso representou $(12,8 \pm 0,5)\%$ de danos gerados. Em relação aos ensaios E3 e E4, esse valor correspondeu a um acréscimo de aproximadamente 7% de células com micronúcleos e, em relação ao valor de referência, 10%. Ao se comparar com ensaio E1 o acréscimo foi de 11%.

Finalmente, para o ensaio E6 (que foi desenvolvido sob a ação de 1,00 g de estéril de urânio e, consequentemente, sob a influência do maior *background* radioativo estimado), a quantidade de células com micronúcleos observada em uma média de 3.000 células analisadas foi de 958 ± 20 . Para esse ensaio, isso representou $(31,9 \pm 0,7)\%$ de danos induzidos. Sendo assim, excedeu em aproximadamente 29% o valor de referência da IAEA para células não

irradiadas e em 30% quando comparado com o ensaio E1. Em relação ao ensaio E5 esse acréscimo de danos foi de aproximadamente 19% e de 26% em relação aos ensaios E3 e E4.

O aumento da frequência de células com micronúcleos indica a intensidade do dano radioinduzido. Sabe-se que nem toda mutação desencadeada por radiação é maléfica ao organismo, porém, dependendo das condições que a causam (tipo de radiação, taxa de dose, dose, *LET* etc) e, portanto, do grau que ocorrem, podem evoluir para um estágio deletério.

É possível perceber que em relação ao ensaio E1 (*in natura*), a média de células com micronúcleos em todos os outros ensaios aumentou. Porém, em relação ao E2 (UV-C), os ensaios E3 (0,25 g de estéril de urânio) e E4 (0,5 g de estéril de urânio), além de terem apresentado médias menores, mantiveram esses valores praticamente iguais entre si. Com base na análise estatística combinada com o teste de Tukey, realizou-se uma comparação par a par entre os 6 ensaios para avaliar a diferença dessas médias de células com micronúcleos.

Desse modo, o ensaio E1 apresentou variância significativa ($p = 0,0002$) em relação a todos os demais ensaios. Isso pode ser interpretado do ponto de vista de que quando é comparado individualmente a incidência de danos deste ensaio com cada um dos outros 5 ensaios, a evolução de danos provocados está diretamente associada ao aumento da concentração de estéril de urânio e, conseqüentemente, dos níveis de atividade presentes nos ensaios E3, E4, E5 e E6 e, no que se refere ao ensaio E2, a exposição prévia ao ultravioleta.

É interessante notar, que ao se comparar a quantidade de danos induzidos no ensaio E2 com os que foram observados nos ensaios E3 e E4, percebe-se que a exposição prévia ao UV-C promoveu mais danos do que quando as sementes foram germinadas na presença das concentrações de 0,25 g e 0,50 g de estéril de urânio, respectivamente. No entanto, a análise da variância da média de células com micronúcleos do ensaio E2 reportou significância estatística tanto em relação aos ensaios E3 e E4 ($p = 0,01$) quanto aos ensaios E5 e E6 ($p = 0,0002$). Nesse sentido, é muito provável que a intensidade da exposição à fonte artificial de UV-C tenha sido maior do que a da exposição radiométrica para as concentrações 0,25 g e 0,50g de estéril.

Como já foi mencionado, a radiação ultravioleta é não ionizante e o dano que é causado à célula deve-se a interação direta com a estrutura do DNA. Com isso, podem ocorrer rupturas nas ligações químicas dos átomos de suas cadeias, ou ainda, via mecanismo de excitação e posteriores desencadeamentos, causar mutação induzida.

A partícula α , que acredita-se ser o principal tipo de radiação que causou os danos nas amostras com estéril de urânio, é extremamente danosa para exposições internas, pois pode causar quebras na fita dupla do DNA. No entanto, devido a composição do tecido biológico ser entre 70% a 80% de água e menos de 1% de DNA, pressupõe-se que esse efeito seja

essencialmente desencadeado por uma ação indireta, isto é, através do ataque de radicais livres produzidos durante a radiólise da água (BUSHONG, 2010).

Os danos causados pela radiação UV-C são induzidos diretamente na molécula de DNA. Já os produzidos pelas radiações ionizantes são induzidos principalmente na molécula de água. Logo, o dano à sua estrutura depende da quantidade de radicais livres que podem ser produzidos após a radiólise e de uma possível interação com eles.

Diante disto, uma baixa intensidade associada a níveis muito baixos de atividade podem não ser suficientes para causar um número de eventos que induzam indiretamente o mesmo grau de dano devido a uma exposição direta e intensa ao UV-C. É provável que isso tenha acontecido com os ensaios submetidos às concentrações de 0,25 g e 0,50 g de estéril de urânio, que tiveram uma redução de aproximadamente 1,4% na média de células com micronúcleos em relação ao ensaio E2.

Como já foi mencionando, os ensaios E3 e E4 não apresentaram entre si grandes diferenças nas médias de células com micronúcleos. A análise de variância para ambos não reportou significância estatística ($p > 0,05$). No entanto, uma possível causa pode ter sido que nessas concentrações de material, 0,25 g e 0,50 g, respectivamente, os níveis de atividade emitidos, por serem muito baixos (Tab. 4.2) e estarem associados ao curto tempo de exposição de 3 dias, contribuíram com a mesma intensidade de danos. Já em relação a variância das médias de células com micronúcleos desses ensaios com a dos ensaios E5 e E6, nota-se significância estatística ($p = 0,0002$), sendo um indicativo de que a concentração de 0,75 g e 1,00 de estéril de urânio possui níveis de atividade suficientes para induzir danos em maiores proporções nesse mesmo intervalo de tempo.

Quando foi aumentada a concentração de estéril para 0,75 g e 1,00 g, o *background* radioativo e, conseqüentemente, a intensidade da exposição também aumentou. Nota-se que essas exposições foram intensas o suficiente para induzirem danos de 5% e 24%, respectivamente, maiores do que os do ensaio E2. O ensaio E5 (0,75 g de estéril de urânio) reportou variância significativa ($p = 0,0002$) somente em relação às médias de células com micronúcleos do ensaio E6, enquanto que o ensaio E6 não reporta significância estatística ($p > 0,05$) em relação a nenhum dos ensaios. Isso reforça a hipótese de que a evolução quantitativa de danos ocorreu conforme o aumento de estéril de urânio empregado nos ensaios E3, E4, E5 e E6.

É pouco provável que tenha ocorrido incorporação dos radionuclídeos investigados neste trabalho pelas raízes de alface. O fato de se utilizar uma amostra de rocha nos ensaios dificultou esse processo, sobretudo, pelos baixíssimos níveis de atividades presentes, que

consequentemente indicam baixos teores desses elementos no estéril de urânio. Além disso, se a incorporação de radionuclídeos tivesse acontecido, os ensaios não iriam apresentar diferenças estatísticas significativas entre as médias de células com micronúcleos, pois o mecanismo de incorporação se apresentaria da mesma forma para todos e, portanto, a indução de danos também. Ademais, os espectros de infravermelho não indicam a presença de compostos estranhos na estrutura bioquímica dos ensaios de alface expostos ao estéril de urânio. Foram observadas apenas rupturas de ligações químicas e uma acentuada remoção de nutrientes da planta, possivelmente capturados pelo íon uranila, como discutido anteriormente. Assim, essas evidências experimentais corroboram com a hipótese de que esses eventos foram desencadeados por radiação. Como esses níveis foram maiores para os ensaios E5 e E6, é de se esperar que o número de eventos de radiólise/radicaais livres e interações diretas com o DNA tenha sido maior do que nos ensaios E3 e E4, explicando assim a diferença observada.

É interessante notar que, para a maior concentração de estéril de urânio utilizada, a intensidade do dano induzido, ou seja, a quantidade de células com micronúcleos foi de quase 30% em relação ao ensaio E1. Devido à alta intensidade do dano, acredita-se que este foi causado principalmente por partículas alfa. Radiações de alta *LET*, como as partículas alfa, deixam uma alta densidade de radicais livres pelo seu trajeto. Além disso, quando a *LET* atinge na célula um valor máximo de 100 keV/ μ m, podem ocorrer dois eventos de ionização que coincidem com o diâmetro da distância entre cada hélice que forma a molécula de DNA (HALL, 1994; IAEA, 2001). Como já foi mencionado, a frequência elevada de micronúcleos indica perda de material genético decorrente de quebras simples e/ou duplas na estrutura de dupla hélice do DNA. Essas perdas podem impedir o processo de multiplicação das células ou desencadear apoptose – morte celular programada, que, pelo número de células com micronúcleos presentes nesse ensaio, é o que se espera acontecer.

Para todos os outros ensaios existe a probabilidade de parte desses danos serem reparados, porém erroneamente. Nessas situações, as células que conseguirem escapar da apoptose acumulam mutações. Além disso, se os micronúcleos conseguirem se reagrupar, podem originar cromossomos aberrantes, ou seja, modificados em relação a estrutura original. Células contendo esse tipo de cromossomo podem se duplicar e dar origem a uma população de células anormais, afetando seriamente o funcionamento de um tecido/órgão (PODGORSK, 2005). Portanto, essas análises indicam que células que são frequentemente expostas aos teores de radionuclídeos desse trabalho e, consequentemente, as suas atividades, têm grandes chances de desencadear o desenvolvimento de um tumor.

4.3.2 INFLUÊNCIA DO *background* RADIOATIVO NAS AMOSTRAS DE CEBOLA

Os dados sobre a influência da variação do *background* radioativo no surgimento de células com micronúcleos dos ensaios com cebola (*Allium cepa*) são mostrados na Tabela 4.6. A partir desses valores foi montado um histograma da médias de células com micronúcleos (MN) por ensaio, que é apresentado na Figura 4.9.

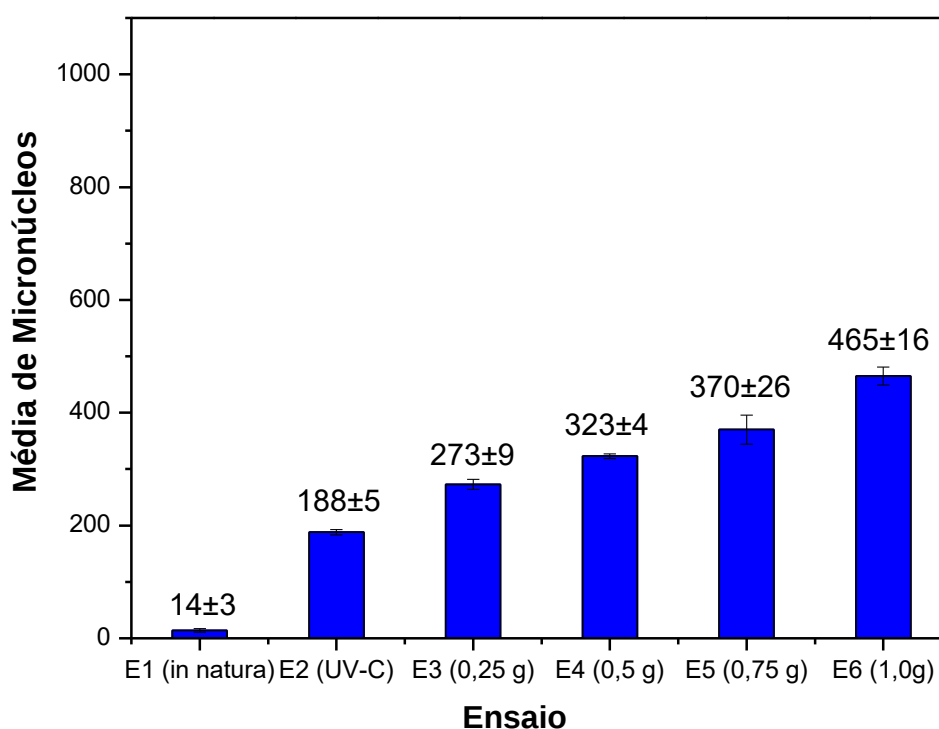


Figura 4.9 – Média de células com micronúcleos nos ensaios com cebola (*Allium cepa*).

Ao se analisar o histograma para os ensaios com cebola, observa-se que para uma média de 3.000 células analisadas no ensaio E1, desenvolvido sob condições naturais, 14 ± 3 células com micronúcleos foram contabilizadas. Em porcentagem isso representou $(0,5 \pm 0,2)\%$ de danos, portanto, estando bem abaixo do valor de 3% de eventos de dano e reparo do DNA que acontecem por fatores de ordem natural (IAEA, 2001).

Para o ensaio E2, que teve as suas sementes expostas a uma fonte de UV-C durante 20 minutos antes de serem postas para germinar, em uma média de 3.000 células analisadas, foram observadas 188 ± 5 células com micronúcleos. Em porcentagem, isso representou $(6,2 \pm 0,2)\%$ de danos gerados. Como já era de se esperar, houve efeitos induzidos devido a essa exposição,

sendo estes de aproximadamente 3% a mais em relação ao valor de referência da IAEA para células não irradiadas e de 5,5% em relação ao ensaio E1. Como já foi mencionado, essa exposição foi proposital, sendo um parâmetro para comparar, por meio do teste de micronúcleos, os danos celulares radioinduzidos nos demais ensaios.

Ao se comparar os ensaios E3 a E6, que foram desenvolvidos sob a influência de 0,25 g, 0,50 g, 0,75 g e 1,00 g de estéril de urânio, respectivamente, a indução de danos teve um comportamento gradual, com todos esses ensaios apresentando uma quantidade de células com micronúcleos maior do que a do ensaio E2.

O ensaio E3 apresentou em uma média de 3.000 células analisadas, 273 ± 9 células com micronúcleos. Isso representou em porcentagem $(9,1 \pm 0,3)\%$ de danos radionduzidos, excedendo em aproximadamente 6% o limite recomendado da IAEA para células não irradiadas e em 8,5% em relação ao ensaio E1.

Para o ensaio E4, em uma média de 3.000 células analisadas, o número de células com micronúcleos foi de 323 ± 4 , equivalendo a $(10,8 \pm 0,2)\%$ de danos radioinduzidos. Isso correspondeu a uma elevação de aproximadamente 2% em relação ao ensaio E3. Para o valor de referência da IAEA para células não irradiadas, o acréscimo foi de cerca de 8% e de 10% em relação ao ensaio E1.

Os ensaios E5 e E6, apresentaram em uma média de 3.000 células de cada um, 370 ± 26 e 465 ± 16 células com micronúcleos, respectivamente. Esses valores representam em porcentagem $(12,3 \pm 0,9)\%$ e $(15,5 \pm 0,5)\%$ de danos radioinduzidos, com uma diferença de aproximadamente 3% entre esses ensaios. Em relação ao valor de referência da IAEA, o ensaio E5 excedeu cerca de 9% e o ensaio E6 em 12,5%. Já em relação ao ensaio E1, esses valores foram de aproximadamente 12% e 15% a mais, respectivamente.

Mediante o teste de Tukey, avaliou-se as diferenças entre os 6 ensaios, comparando par a par as médias de células com micronúcleos de cada um. O ensaio E1 (*in natura*) reportou significância estatística ($p = 0,0002$) com todos os outros 5 ensaios. Isso, por sua vez, já era esperado, uma vez que os outros ensaios contavam com agentes indutores de mutação, sendo a exposição prévia ao UV-C no ensaio E2 e a variação de concentração de estéril de urânio e, consequentemente, do *background* radioativo, nos demais ensaios.

Para as células de cebola, nota-se que todos os ensaios expostos às diferentes concentrações de estéril de urânio apresentaram as médias de células com micronúcleos superiores ao ensaio E2 (UV-C). Como discutido anteriormente, esse comportamento pode estar associado aos fatores de intensidade e tempo de exposição à radiação. Para os ensaios que usaram a cebola como bioindicador são necessários 7 dias para a germinação de sementes e

obtenção de suas raízes. Portanto, esse foi o período de exposição de suas células ao *background* radioativo. Estatisticamente, o ensaio E2 expressou variância significativa ($p = 0,0002$) em relação as médias dos ensaios expostos ao estéril de urânio, ou seja, todos esses ensaios apresentaram danos maiores que o E2.

Considerando-se a análise estatística, a média de células com micronúcleos do ensaio E3 mostrou variância significativa tanto em relação ao ensaio E4 ($p = 0,007$) quanto em relação aos ensaios E5 e E6 ($p = 0,0002$). Esse comportamento também foi observado ao se comparar as médias do ensaio E4 com os ensaios E5 ($p = 0,01$) e E6 ($p = 0,0002$), respectivamente, bem como do ensaio E5 com o ensaio E6 ($p = 0,0002$).

Acredita-se que não houve incorporação dos radionuclídeos investigados neste trabalho pelas raízes de cebola, pois se assim tivesse ocorrido, os ensaios expostos ao estéril de urânio não apresentariam diferenças estatisticamente significativas nas médias de células com micronúcleos, pois o mecanismo de incorporação seria o mesmo em todos os ensaios e, portanto, a frequência de danos também. Os resultados da espectrometria gama corroboram com essa hipótese. As baixas atividades indicam baixíssimos teores desses radionuclídeos na amostra de estéril de urânio. No meio ambiente, o processo de lixiviação em amostras de rocha (que é muito mais agressivo que o procedimento experimental desenvolvido nesta dissertação) é um evento muito raro (EISENBUD, GESELL 1997; BONOTO, 2004). Esse fato somado aos baixos teores de radionuclídeos investigados torna praticamente impossível essas espécies terem sido incorporadas. Além disso, embora as análises dos espectros de infravermelho da cebola terem indicado rupturas de ligações químicas e uma leve remoção de nutrientes da sua estrutura bioquímica, não foram detectados compostos estranhos à sua matriz, dando fortes indícios de que esses eventos foram desencadeados por radiação.

A probabilidade de incidência de danos ao tecido biológico é proporcional a intensidade e ao tempo de exposição à radiação. O grau do dano depende, entre outros fatores, do tipo da radiação. Assim, nos ensaios E3 a E6, acredita-se que a formação de micronúcleos se deu, principalmente, devido à radiação alfa. Diante disto, mesmo considerando que a fonte artificial de UV-C tenha uma intensidade maior que a do estéril de urânio, o tempo em que as células de cebola ficaram expostas a esse material foi significativo para promover danos maiores do que os observados no ensaio E2, inclusive, para a concentração mais baixa de estéril (0,25 g) utilizada. Esses acréscimos também se mantiveram quase que graduais para os ensaios E4, E5 e E6 (Fig. 4.9), porém, mostrando-se com diferenças significativas entre si, como apresentado na análise estatística.

Quando a partícula α incide num material, devido à sua alta velocidade, ela interage por pouco tempo com os elétrons envoltórios dos átomos do meio e, assim, a ionização é pequena e quase constante. À medida que a partícula vai perdendo energia, essa interação vai se tornando mais efetiva com os elétrons do meio, até capturar um elétron e mudar de íon $2+$ para $1+$. Após esse evento, o seu poder de ionização cai rapidamente para zero, quando o íon $1+$ captura outro elétron e se torna um átomo de hélio eletricamente neutro.

A trajetória que a partícula α percorre em um material é praticamente retilínea. No tecido biológico, o alcance de uma partícula α com energia de 4,00 MeV (que fica dentro da faixa de energia associada aos decaimentos do ^{238}U ou ^{226}Ra , por exemplo) é de 155 μm . Cumpre ressaltar, que o diâmetro de uma célula vegetal varia de 30 a 100 μm , enquanto que para uma célula animal esse valor fica em torno de 10 a 50 μm (OKUNO, 1982), ou seja, em ambos os casos, podem ser danificadas mais de uma célula devido a interação com uma única partícula. Essas células mantendo a sua capacidade reprodutiva podem originar uma lesão e, futuramente, um câncer radioinduzido, sobretudo, porque esse tipo de radiação tende a produzir quebras duplas na estrutura do DNA, que como já foi mencionado são muito mais difíceis de serem reparadas e, quando são, geralmente acontecem de forma errônea induzido falhas grosseiras. O número de danos que a partícula alfa produz se associa aos eventos de ionização que desencadeia na matéria. Além disso, como também já foi mencionado, devido à alta *LET* que a partícula α possui, no seu trajeto é deixada uma grande quantidade de radicais livres e, como se sabe, essas espécies são altamente reativas. Por isso, exposições por períodos maiores são suscetíveis a desencadear danos mais severos.

A frequência de células com micronúcleos reflete a quantidade de eventos mutagênicos. Quando esses valores excedem o limite de 3%, há uma tendência ao aumento da probabilidade de desenvolvimento de lesões futuras. Nos ensaios que tiveram estéril de urânio isso pôde ser observado quase que gradualmente. Caso sejam efetuados eventos de reparo errôneo, há grandes chances de desencadear o desenvolvimento de uma neoplasia.

Apesar de ambos os bioindicadores indicarem mutagenicidade desencadeada pela variação do baixo *background* radioativo, nota-se que a gravidade do dano ocorreu em função da intensidade da exposição à radiação. Esta, por sua vez, sofreu influência da diferença da concentração de estéril de urânio combinada ao tempo em que as suas respectivas células ficaram expostas a esse material. Por isso, também se efetuou um comparativo estatístico sobre essa influência nos bioindicadores utilizados para esse experimento. Isso é apresentado na seção 4.3.3.

4.3.3 AVALIAÇÃO DA RADIOSSENSIBILIDADE DOS BIOINDICADORES

A partir dos dados das Tabelas 4.4 e 4.5 foi montando um histograma que compara a média de células com micronúcleos por ensaio entre os bioindicadores. Isso é apresentado através da Figura 4.10.

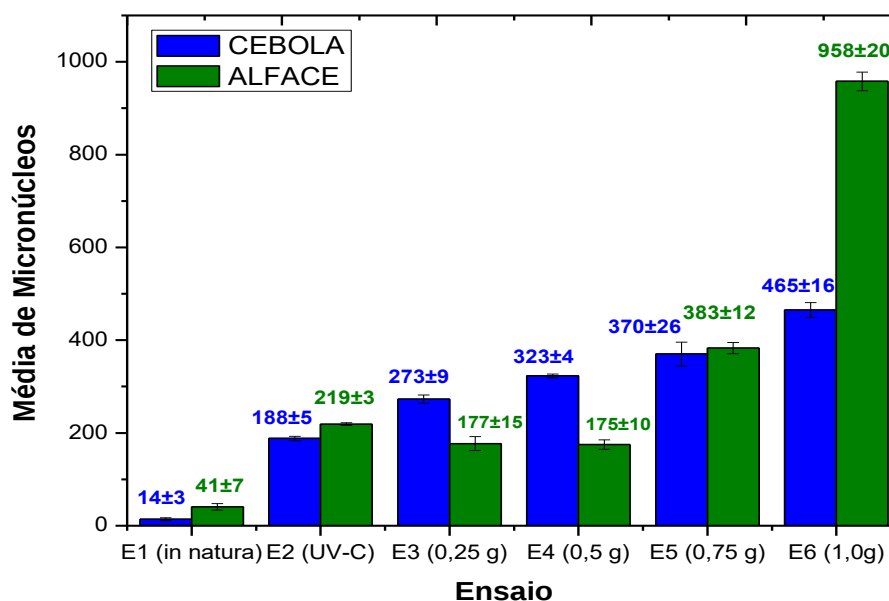


Figura 4.10 – Média de células com micronúcleos por ensaio de ambos os bioindicadores.

Comparando-se a frequência de células com micronúcleos por ensaio entre os bioindicadores (Fig. 4.10), nota-se que para os que foram desenvolvidos sob condições naturais (E1), houve uma incidência de danos maior para o bioindicador alface. Esse comportamento já era esperado devido à sua alta sensibilidade. A análise estatística concorda com esses dados, demonstrando diferença estatisticamente significativa ($p = 0,003$) entre essas médias. Cumpre ressaltar, que embora a média de células com micronúcleos tenha sido maior para os ensaios com alface, para ambos os bioindicadores, esse valor ficou abaixo do limite de 3% considerado como eventos normais, sendo obtido $(1,4 \pm 0,2)\%$ para as células de alface e $(0,5 \pm 0,2)\%$ para as de cebola. Eventos de dano e reparo do DNA também transcorrem naturalmente devido a estabilidade intrínseca que essa molécula exibe. Esse comportamento é observado devido a necessidade de substituição de células que teriam um curto período de vida, por exemplo (BUSHONG, 2010).

Do mesmo modo, quando foi verificada a intensidade do dano, isto é, o número de células com micronúcleos (MN), nos ensaios submetidos a irradiação prévia com uma fonte de UV-C (E2), novamente as médias dos ensaios com alface se destacaram. A análise estatística demonstrou mais uma vez concordância com o fato das células de alface serem mais sensíveis que as de cebola, reportando diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0008$). Em termos de porcentagem, os danos induzidos pela exposição prévia das sementes ao UV-C foram de $(7,3 \pm 0,1)\%$ para as células de alface e de $(6,2 \pm 0,2)\%$ para as de cebola. Ambos excederam o limite de 3% recomendado pela IAEA (IAEA, 2001).

Os ensaios E3 a E6 foram os desenvolvidos sob o efeito da variação do *background* radioativo devido aos radionuclídeos presentes no estéril de urânio.

Nos ensaios E3 foram observados $(5,9 \pm 0,5)\%$ de danos para as células de alface e $(9,1 \pm 0,3)\%$ para as de cebola. Um comportamento similar também foi observado para os ensaios E4, nos quais contaram com $(5,9 \pm 0,4)\%$ de danos para as células de alface e $(10,8 \pm 0,2)\%$ para as de cebola. Isso representou uma redução de aproximadamente 3,2% e 4,9%, respectivamente, em relação ao percentual de danos ocorridos nos ensaios E3 e E4 da cebola, reportando um comportamento diferente dos ensaios E1 e E2, que contaram com maior número de células com micronúcleos nos ensaios com alface.

Apesar disso, a análise estatística se manteve com uma diferença estatisticamente significativa tanto para o comparativo de danos dos ensaios E3 ($p = 0,001$) quanto para os ensaios E4 ($p = 0,0003$) entre os bioindicadores, afetando a teoria de maior sensibilidade das células de alface. No entanto, o tempo de germinação dessas espécies é diferente e, como consequência, o tempo de exposição à radioatividade também. São necessários 7 dias para a germinação das amostras de cebola e apenas 3 dias para as de alface, portanto, as células de alface ficaram expostas ao *background* radioativo 4 dias a menos. Como as atividades estimadas para as concentrações de estéril de urânio empregadas nos ensaios (Tab. 4.2) são muito baixas, combinadas a um tempo muito curto podem não ser suficientes para inferirem danos na mesma proporção que nos ensaios de cebola. Logo, se os bioindicadores fossem mantidos durante o mesmo tempo de exposição, provavelmente seria observado um comportamento similar aos ensaios E1 e E2, que apresentaram médias de células com micronúcleos maiores nas amostras de alface.

Nos ensaios E5, a ocorrência de células com micronúcleos se manteve praticamente a mesma para ambos os bioindicadores. A análise estatística não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$). No entanto, isso volta a reafirmar a radiosensibilidade das células de alface. Embora o tempo de exposição tenha sido menor para essas células, o *background* radioativo

associado a concentração de estéril de urânio presente nesses ensaios começou a ser suficiente para induzir efetivamente danos ao DNA, dando indícios de que este evento sofreu interferência do tempo nos ensaios E3 e E4. Isso se mostrou mais evidente quando foi feito o comparativo entre os ensaios E6, onde a amostra de alface apresentou quase o dobro dos danos que foram induzidos na de cebola. A análise estatística demonstrou concordância com esses dados ($p = 0,0003$).

Diante disto, ao se comparar os bioindicadores, é perceptível que quando é variada a concentração de estéril de urânio, apenas as células de cebola responderam com um grau de concordância entre os seus ensaios. Contudo, isso também está associado ao tempo de exposição ao *background* radioativo, que foi de 4 dias a mais em relação ao da alface, aumentando assim o nível da exposição para essas células. Para os ensaios com alface, que ficaram expostos 4 dias a menos que os de cebola, o tempo só deixou de influenciar a intensidade da exposição e, consequentemente a incidência de danos, para as concentrações de 0,75g e 1,00 g de estéril. Assim, como os ensaios E5 e E6 de alface foram expostos às mesmas concentrações de estéril de urânio que os ensaios E5 e E6 de cebola, porém, por um intervalo de tempo inferior, as médias de danos próximas e superiores entre os bioindicadores reafirmam a hipótese de que células de alface são mais radiosensíveis que as de cebola.

Desse modo, conclui-se que mesmo para baixas concentrações de radionuclídeos, porém, incorporadas frequentemente, há um grande potencial de seus *backgrounds* induzirem danos locais, que podem ir se acumulando e, futuramente, evoluírem para uma carcinogênese.

Como discutido anteriormente, o alcance de uma partícula alfa de energia de 4,00 MeV (que está dentro da faixa de energia, por exemplo, dos decaimentos do ^{238}U e do ^{226}Ra) tem um alcance de 155 μm . Uma célula vegetal possui de 30 a 100 μm de diâmetro, enquanto que uma célula animal possui de 10 a 50 μm . Logo, em ambos os casos podem ser danificadas mais de uma célula com a emissão de uma única partícula. É interessante notar, que ao se comparar esses diâmetros isso pode ser mais acentuado para células animais, ou seja, os resultados aqui mostrados podem ser mais severos em humanos. E, como já foi discutido, se essas células mantiverem seu caráter reprodutivo podem evoluir para uma lesão e, futuramente, um câncer radioinduzido.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, investigamos os efeitos adversos ocasionados por baixas concentrações de radionuclídeos, mais especificamente devido aos seus *backgrounds* radioativos, dando ênfase ao ^{238}U , ^{232}Th e ^{40}K . Como já foi mencionado, esses radionuclídeos são os que mais contribuem para a elevação dos níveis de exposição interna à radioatividade natural, principalmente, em regiões de potencial radioativo, pois podem ser facilmente transferidos do solo para os alimentos e/ou água e, portanto, fazerem parte da dieta diária da população local.

Pela primeira vez foram utilizados bioindicadores vegetais expostos à diferentes concentrações de estéril de urânio (0,25 g, 0,50 g, 0,75 g e 1,00 g). Foram usadas sementes de cebola (*Allium cepa*) e sementes de alface (*Lactuca sativa*). Demonstrou-se que é possível verificar o efeito de baixas concentrações de radionuclídeos em induzir danos às células dessas espécies. Com isso, provou-se a possibilidade de usar plantas como bioindicadores para efeitos da radiação. As plantas ditas eucarióticas possuem processos de mutação similares ao do homem. Então, a identificação prévia dessas alterações no meio ambiente pode gerar um alerta para a humanidade. Como ainda não há uma padronização entre os métodos e/ou bioindicadores testados na literatura, inexiste um protocolo que unifique os campos de dosimetria, epidemiologia e radiobiologia em prol de um modelo biodosimétrico consistente. Por conseguinte, em trabalhos futuros é interessante realizar esse estudo com células humanas, a fim de correlacionar esses resultados com os presentes dados e consolidar uma posição científica a respeito dos danos ao tecido biológico ocasionados por baixas doses de radiação.

Cumprir ressaltar que a metodologia desenvolvida neste trabalho deu ênfase a avaliação de um cenário de danos radioinduzidos, quando a fonte já se encontra dentro do corpo.

Para ambos os bioindicadores é pouco provável que os danos tenham transcorrido por causa de incorporação de radionuclídeos presentes no estéril. Porém, devido ao estudo ter sido realizado a partir de bioindicadores vegetais, não descartamos totalmente a possibilidade de que essas mutações pudessem ser induzidas por uma incorporação de radionuclídeos, mesmo sendo estabelecidas condições de contorno para que essa hipótese se mantivesse nula.

Os baixíssimos níveis de atividade, que indicam baixos teores dos radionuclídeos investigados na amostra de estéril de urânio, tornam praticamente impossível lixiviações e posteriores transferências. Além disso, embora os espectros de infravermelho tenham revelado a ocorrência de rupturas de ligações químicas e remoção de nutrientes com afinidade eletrônica para o urânio, não foram detectados modos vibracionais relacionados a esse elemento nos bioindicadores expostos ao estéril, bem como não se detectou nenhum modo vibracional relacionado a algum composto estranho às matrizes bioquímicas da alface e da cebola. Por fim, a análise estatística reportou diferenças significativas entre as médias de células com micronúcleos dos ensaios, ou seja, reforçando que não houve incorporação, pois se assim tivesse ocorrido, não seriam observadas diferenças, uma vez que o processo teria acontecido da mesma forma em todos os ensaios e, conseqüentemente, a frequência de danos também.

Diante disto, esses dados corroboram com a hipótese de que as mutações foram radioinduzidas.

Devido às intensidades de danos nos ensaios expostos ao estéril de urânio serem todas superiores ao limite recomendado pela IAEA, acredita-se que eles tenham sido induzidos principalmente por radiação α . Ao se comparar os diâmetros das células, devido ao alcance da partícula alfa, o dano causado por esse tipo de radiação pode ser mais acentuado em células animais do que em vegetais. Ou seja, os resultados mostrados nesse trabalho podem ser mais severos em humanos.

Atualmente, a maioria das normas de proteção radiológica se baseiam em resultados de exposição X e gama (ICRP, 2007). Assim, usar bioindicadores com um bom grau de concordância com órgãos-alvo ou tecidos para o urânio e/ou de radionuclídeos emissores de radiação alfa pode ajudar a melhor compreender os efeitos desse tipo de radiação no homem, inclusive, para baixas doses.

Com os dados apresentados, conclui-se que mesmo para baixas concentrações de radionuclídeos, porém, incorporadas frequentemente há um potencial carcinogênico que pode estar associado principalmente a alta *LET* dos emissores de radiação alfa. Como já foi

discutido, se esses eventos forem diários e se as células danificadas mantiverem seu caráter reprodutivo podem evoluir para uma lesão e, futuramente, um câncer radioinduzido.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Utilizar amostras de rocha contendo urânio natural com atividades compatíveis com as apresentadas nas regiões de alto *background* radioativo;
- ✓ Realizar medidas de espectrometria alfa, beta e gama dessas amostras para estimar as atividades por radionuclídeo e, posteriormente, convertê-las em taxas de dose e/ou doses associadas ao tipo de radiação que emitem;
- ✓ Verificar a composição química dessas amostras;
- ✓ Inserir no estudo células sanguíneas de linfócitos periféricos como bioindicador e comparar a quantidade danos com os ocorridos nos bioindicadores vegetais já testados;
- ✓ Construir curvas de dose-resposta para os 3 bioindicadores, ajustando-as pelos modelos de regressão conforme a dose por tipo de radiação;
- ✓ Modelar e simular computacionalmente o surgimento de tumores radioinduzidos por baixas taxas de doses *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUMURAD K. M. Natural radioactivity due to radon in Soum region, Jordan. **Radiation measurements** - 39:77-80, 2005.

AMENABAR, I.; POLY, S.; NUANSING, W.; HUBRICH, E. H.; GOVYADINOV, A. A.; HUTH, F.; KRUTOKHVOSTOV, R.; ZHANG, L.; KNEZ, M.; HEBERLE, J.; BITTNER, A. M.; HILLENBRAND, R. Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy. **Nature communications**, 4, 2013.

ANJOS, R.; VEIGA, R.; SOARES, T.; SANTOS, A.; AGUIAR, J.; FRASCÁC, M.; BRAGE, J.; UZÊDA, D.; MANGIA, L.; FACURE, A.; MOSQUERA, B.; CARVALHO, C.; GOMES, P. Natural radionuclide distribution in brazilian commercial granites. **Radiation measurements**, 39(3):245- 253, (2005).

ARRUDA NETO, J. D. T.; GUEVARA, M. V. M.; NOGUEIRA, G. P.; TARICANO, I. D.; SAIKI, M.; ZAMBONI C. B.; BONAMIN, L. V.; CAMARGO, S. P.; CESTARI, A. C.; DEPPMAN, A.; GARCIA, F.; GOUVEIA, A. N.; GUZMAN V. R. Long-term accumulation and microdistribution of uranium in the bone and marrow of beagle dog. **Int. J. of Rad. Biology**. v. 80, n. 8, p. 567-575, 2004.

ATSDR. Toxicological profile for uranium. U.S. department of health and human services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2013. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp150.pdf>>. Acesso em 21 de Jun. 2018.

ATTIX, F. H. **Introduction to radiological physics and radiation dosimetry**. Alemanha: WILEY-VCH, 1986.

BARROS, A. C.; *et al.* Identification of irradiated wheat by germination test DNA comet assay and electron spin resonance. **Radiation Physics and Chemistry**, Philadelphia, v.63, p. 423-425, Mar. 2002.

BIRAL, A. R. **Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos**. Florianópolis: Ed. Insular Ltda, 2002.

BONOTO, D. M. **Radioatividade nas águas**: da Inglaterra ao Guarani. São Paulo: Editora UNESP, 2004.

BONOTO, D. M.; SILVEIRA, E. G. **Geoquímica do urânio aplicada a águas minerais**. São Paulo: Editora UNESP, 2006.

BUSHONG, S. C. **Ciência radiológica para tecnólogos**: física, biologia e proteção. [tradução Sandro Martins Dolghi *et al.*]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

CAMPOS, J. M. S.; *et al.* Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**, New York, v.22, p. 143-152, Jul. 2008.

CAMPOS, S. S.; ALMEIDA, G. M.; GENNARI, R. F.; SOUZA, S. O. Presença de urânio na água e em solo de Caetité deve-se a fatores ambientais. **Brasil Nuclear**. v.16, n.38, p.10-13, 2012.

CHAUHAN, V.; HOWLAND, M.; KUTZNER, B.; MCNAMEE, J. P.; BELLIER, P. V.; WILKINS, R. C. Biological effects of alpha particle radiation exposure on human monocytic cells. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.215, p. 339-344, Abr. 2012.

CHUNG, K. C. **Introdução à Física Nuclear**. Editora: Ed. UERJ, Rio de Janeiro, 2001.

CNEN - COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. CNEN-NE 1.04: Radiações ionizantes e a vida. Rio de Janeiro, CNEN, 2001.

COUNTRYMAN, P. I., HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat. Res.** v. 41, p. 321-332, 1976.

COUTINHO, E. F.; SILVA JÚNIOR, J. L.; HAERTER, J. A.; NACHTIGALL, G. R.; CANTILLANO, R. F. F. Aplicação pós-colheita de luz ultravioleta (UV-C) em pêssegos cultivar Jade, armazenados em condição ambiente. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.33, n. 4, p. 663 – 666, jul.- ago. 2003.

CROUTHAMEL, C.E., ADAMS, F. DAMS, R. **Applied gamma-ray spectrometry**. Institute of Nuclear Sciences, Ghent State University, Belgium, 1970.

DOVBESHKO, G. I.; GRIDINA, N. Y.; KRUGLOVA, E. B.; PASHCHUCK, O. P. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta*, 53(1), 233–246, 1997.

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.

EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física Quântica**: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas. 20. ed., Editora Campus, Rio de Janeiro, 1979.

EISENBUD, M.; GESELL, T. **Environmental radioactivity**: from natural, industrial and military sources. 4. ed. New York: Academic Press, Inc., 1997.

EL-SHAHABY, O. A.; ABDEL MIGID, M. I.; SOLIMAN M. I.; MASHALY, I. A. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. **Pak J Biol Sci** 6: 23-28, 2003.

ESTADÃO BRASIL, 2015. Disponível em <<https://brasil.estadao.com.br/noticias/geral,governo-baiano-admite-maior-incidencia-de-cancer-em-regiao-contaminada-por-uranio,1771373>> Acesso em 15 de Jun. 2018.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human Micronucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, 428(1-2): 271-283, 1999.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, 2(5): 1084-1104, 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v.102, n.1, p. 99-112, 1985.

FROEHLICH, K. Environmental Radionuclides: Tracers and Timers of Terrestrial Processes. In: **Radioactivity in the Environment Series**. Volume 16, pp. 1-438 Great Britain: Elsevier Inc, 2009.

GHIASSI-NEJAD, M.; BEITOLLAHI, M. M.; ASEFI, M.; REZA-NEJAD, F. Exposure to ²²⁶Ra from consumption of vegetables in the high level natural radiation area of Ramsar-Iran. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.66, p. 215-225, 2003.

GOUVÊA, M. M.; LIMA, G. S.; SILVA NETO, A. A.; PEREIRA NETTO, A. D.; MARQUES, F. F. C. Aplicação da radiação ultravioleta como forma de contribuição para a química verde e construção de um reator fotoquímico alternativo e de baixo custo, para pré-tratamento de amostras. **Química Nova**. São Paulo, v. 37, n. 2, p. 337 – 343, abr. 2014.

GRANT, W. F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environ Health Persp.** 27: 37-43, 1978.

GRANT, W. F. Chromosome aberrations assay in A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene- Tox Programme. **Mutation Res.** 99: 273-291, 1982.

GREENPEACE. **Ciclo do perigo: impactos da produção de combustível nuclear no Brasil**, 2008.

GRIFFITHS, P. R.; HASETH, J. A. **Fourier transform infrared spectrometry**. ed. 2nd. Hoboken, New Jersey, 2007.

GROVER, I. S.; DHINGRA, A. K.; ADHIKARI, N.; LADHAR, S. S.; Genotoxicity of pesticides and systems. **Progr Clin Biol Res.** 340E: 91-106, 1990.

GUIMARÃES, V. S.; BRASIL, I. M.; CAMPOS, S. S.; GENNARI, R. F.; ATTIE, M. R. P.; SOUZA, S. O. Dose due the Incorporation of Radionuclides Using Teeth as Bioindicators nearby Caetité Uranium Mines. **World Academy of Science, Engineering and Technology**. v.5, p. 1144-1148, 2011.

- HALL, E. J. **Radiobiology for the radiologist**. cap. 2. p. 15-27. Philadelphia, JB. Lippincott, 1994.
- HAMMOND, C. R.; HAYNES, W. M. **Handbook of Chemistry and Physics**. The Elements. Oxford: CRC Press, v. 93, p. 4-40, 2012.
- HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E. **Lehrbuch der anorganischen chemie**. Berlim: Walter de Gruyter, 1960.
- IAEA - International Atomic Energy Agency, Technical report series, Measurements of radionuclides in food and the environment, **Vienna: IAEA**, n. 295, 1989.
- IAEA - International Atomic Energy Agency, Technical report series, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. a manual. **Vienna: IAEA**, n. 405, 2001.
- IAEA - International Atomic Energy Agency. Radiation protection and the management of radioactive waste in the oil and gas industry. (Training Course Series n. 40). **Vienna: IAEA**, 2010.
- IAEA, 2017. Disponível em: <<https://www.iaea.org/newscenter/news/natural-radioactivity-in-food-experts-discuss-harmonizing-international-standards>>. Acesso em 01 de Jun. 2018.
- ICRP. The 2007 recommendations of the International Commission on Radiological Protection. **ICRP Publication 103 Ann. ICRP 37 (2-4)**
- KNOLL, G. F. **Radiation detection and measurement** – 4 ed. New York: John Wiley and Sons Inc., 2010.
- KOVALCHUK, O.; KOVALCHUK, I.; ARKHIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUK, L. The Allium cepa chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutation Research* 415, 47–57, 1998.
- LAURENT, O.; GOMOLKA, M.; HAYLOCK, R.; BLANCHARDON, E.; GIUSSANI, A.; ATKINSON, W.; BAATOUT, S.; BINGHAM, D.; CARDIS, E.; HALL, J. Concerted Uranium Research in Europe (CURE): toward a collaborative project integrating dosimetry, epidemiology and radiobiology to study the effects of occupational uranium exposure. **Journal of Radiological Protection**, v.36, n.2, 2016.
- MACHADO, G. C.; FAÊDA, K. C. M.; LAMEIRAS, F. S. Caracterização de UO₂ por espectroscopia de absorção no infravermelho.
- MAGALHÃES, M. H.; AMARAL, E. C. S.; SACHETT, I.; ROCHEDO, E. R. R. Radon-222 in Brazil: an outline of indoor and outdoor measurements. **Journal of Environmental Radioactivity** - 67:131-143, 2003.
- MARCON, A. E.; NAVONI, J. A.; GALVÃO, M. F. O.; GARCIA, A. C. F. S.; AMARAL, V. S.; PETTA, R. A.; CAMPOS, T. F. C.; PANOSSO, R.; QUINELATO, A. L.; MEDEIROS, S. R. B. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. **Chemosphere**, v.167, Jan. 2017.

MASOOMI, J. R.; MOHAMMADI, S. H.; AMINI, M.; GHIASSI-NEJAD, M. High background radiation areas of Ramsar in Iran: evaluation of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE). **Journal of Environmental Radioactivity** 86, 176–186, 2006.

MILIAN, F. M. **Estudo *in vitro* dos efeitos radiobiológicos no DNA plasmidial com radiações ionizantes de baixo LET**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006, 158 p. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física, São Paulo, 2006.

MOHAMMADI, S.; TAGHAVI-DEHAGHANI, M., GHARAATI, M. R.; MASOOMI, R.; GHIASSI-NEJAD, M. Adaptive response of blood lymphocytes of inhabitants residing in high background radiation areas of Ramsar-micronuclei, apoptosis and comet assays. **Journal of Radiation Research (Tokyo)** 47, 279–285, 2006.

OJOVAN, M. I.; LEE, W. E. **An Introduction to Nuclear Waste Immobilisation**. Great Britain: Elsevier Ltda. 2005. ISBN: 978-0-08-044462-8.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harbra, 1982.

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

OLIVEIRA, R. S. S. **Espectroscopia de infravermelho (por transformada de Fourier)**. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2014, 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Modelagem de Materiais) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2014.

PEREIRA, M. A.; DIAS, A. R.; FARAJ, S. F. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. **Histopathology**, v.66, p.388-397, 2015.

PEREIRA, R.; MARQUES, C. R.; FERREIRA, M. J. S.; NEVES, M. F. J. V.; CAETANO, A. L.; ANTUNES, S. C.; MENDO S.; GOLÇALVES, F. Phytotoxicity and genotoxicity of soils from an abandoned uranium mine area, **Appl. Soil Ecol.** 42 209–220, 2009.

PETERSON, P. G. **Tables of molecular vibrational frequencies consolidated**. Ed. NSRDS, Tokyo, 1972.

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

PORTIS, I. G.; HANUSCH, A. L.; PENA, R. V.; JÚNIOR MARQUES, H.; SILVA, C. C.; CRUZ, A. D. Bioensaios em toxicogenética do fungicida tebuconazole. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.21, p. 2080-2093, 2015.

PTACEK, O.; STAVREVA, D. A.; KIM, J. K.; GICHNER, T. Induction and repair of DNA damage as measured by the comet assay and the yield of somatic mutations in gamma-irradiated tobacco seedlings. **Mutation Research** 491, 17–23, 2001.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, n.1, p. 17-24, Feb. 1994.

ROCHEDO, E. R. R. **Avaliação de impacto radiológico ambiental**. Instituto de Radioproteção e Dosimetria. Rio de Janeiro, 132 p. 2003.

ROSA, M. M. L **Avaliação dos teores de U, Th, 226Ra, 228Ra, 210Pb e outros elementos de interesse presentes em cogumelos em uma região de elevada radioatividade natural no Brasil**. Dissertação. Tecnologia Nuclear – Aplicações. IPEN. 2012.

SAGHIRZADEH, M.; GHARAATI, M. R.; MOHAMMADI, S.; GHIASSI-NEJAD, M. Evaluation of DNA damage in the roots cells of *Allium cepa* seeds growing in soil of high background radiation areas of Ramsar – Iran. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.99, p. 1698-1702, 2008.

SANTOS JÚNIOR, J. A. **Migração de urânio e rádio-226 no solo em torno da ocorrência uranífera do município de Pedra – PE**. Recife, 2005. 107 p. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Departamento de Engenharia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, 2005.

SAPUCAIA, N.S. **Diferenciação litológica, teores de potássio, urânio e tório e taxa de produção de calor radiogênico do embasamento cristalino de bacias de Camamu e Almada**. Salvador, 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Geofísica. Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia, 2004.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, 43(1), 13–25, 2007.

SILVA, R. C. **Identification of Alzheimer biomarkers by FTIR – a pilot study**. Aveiro, 2013. 110 págs. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Aveiro, 2013.

STREFFER, C.; MÜLLER, W. U.; KRYSCIO, A.; BÖECKER, W. Micronuclei - biological indicator tor retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation. **Mutat Res.**, v. 404, p. 101-105, 1998.

SUZUKI, M. F.; SILVA, M. A.; CALDEIRA FILHO, J. S.; COLTURATO, M. T.; ARAÚJO, E. B.; BARTOLINI, P.; OKAZAKI, K. Genotoxic evaluation of [DOTA, Tyr³] octreotate labelled with ¹³¹I and ¹⁷⁷Lu in human peripheral lymphocytes in vitro by micronucleus assay. **International Journal of Low Radiation**, v. 4, p. 161-168, 2007.

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

TONETTO, E. M.; BONOTTO, D. M. Mobilização de tório em águas subterrâneas de Águas da Prata, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 32, n. 3, p. 343-350, 2002.

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

UNSCEAR – United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: sources and effects of ionizing radiation. Vienna, 2000, v.1.

VALGODE, F. G. S.; SILVA, M. A.; VIEIRA, D. P.; RIBELA, M. T. C. P.; BARTOLINI, P.; OKAZAKI, K. Cytotoxic and genotoxic effects of ¹³¹I and ⁶⁰Co in follicular thyroid cancer cell (WRO) with and without recombinant human thyroid-stimulating hormone treatment. **Environmental and molecular mutagenesis**. v. 58, p. 451-461, 2017.

VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science Total Environment**, Berlin, v. 378, p. 63-66, Nov.2007.

XAVIER, A. M.; MORO, J. T.; HEILBRON, P. F. **Princípios Básicos de Segurança e Proteção Radiológica**. 3. ed. revisada. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

WHO 1 WORD HEALTH ORGANIZATION Guidelines for Drinking-water Quality, 4.ed., 2011.

WATANABE, N.; YOKOYAMA, K.; KINUYA, S.; SHUKE, N.; SHIMIZU, M.; MICHIGISHI, T.; TONAMI, N.; SETO, H.; GOODWIN, D. A. Radiotoxicity after Iodine-¹³¹ therapy for thyroid cancer using the micronucleus assay. **J. Nucl. Med.**, v. 39, p.436-440, 1998.

ZÖLZER, F.; SKALICKÁ, Z. F.; HAVRÁNKOVÁ, R.; HON, Z.; NAVRÁTIL, L.; ROSINA J.; SKOPEK, J. Enhanced frequency of micronuclei in lymphocytes from current as opposed to former uranium miners. **Journal of Applied Biomedicine**, 9(3), 151–156. doi:10.2478/v10136-011-0002-7, 2011.