



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

SAMUEL LIMA DE SANTANA

APLICAÇÃO DO ORGANISMO MODELO *Drosophila melanogaster* PARA DETECÇÃO DA GENOTOXICIDADE ASSOCIADA À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Vitória de Santo Antão - PE

2018

Samuel Lima de Santana

APLICAÇÃO DO ORGANISMO MODELO *Drosophila melanogaster*
PARA DETECÇÃO DA GENOTOXICIDADE ASSOCIADA À POLUIÇÃO
ATMOSFÉRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Área de Concentração: Biologia da Conservação

Orientadora: Dra. Claudia Rohde

Vitória de Santo Antão - PE

2018

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Giane da Paz Ferreira Silva, CRB-4/977

S232a Santana, Samuel Lima de.
Aplicação do organismo modelo *Drosophila melanogaster* para detecção da genotoxicidade associada à poluição atmosférica / Samuel Lima de Santana. - Vitória de Santo Antão, 2018.
63 folhas: il. fig., tab..

Orientadora: Cláudia Rohde
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2018.
Inclui referências.

1. Biomonitoramento ambiental. 2. Poluição urbana. 3. Usinas termelétricas.
4. *Drosophila melanogaster*. I. Rohde, Cláudia (Orientadora). II. Título.

595.774 (23.ed)

BIBCAV/UFPE-27/2018

Samuel Lima de Santana

Data da Defesa: 27/02/2018

Banca Examinadora:

Dr. Cristiano Aparecido Chagas
(Núcleo de Biologia CAV- UFPE)

Dra. Geórgia Fernanda Oliveira
(Secretaria de Educação de Pernambuco – SEDUC)

Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo
(Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE)

Vitória de Santo Antão

2018

Dedico esta, assim como as demais conquistas, aos meus amados pais
(Reginaldo Sotero e Maria do Socorro) que sempre estiveram presentes,
com demonstração de apoio, incentivo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

“Graças, porém, a Deus que em Cristo sempre nos conduz em triunfo, e por meio de nós difunde em todo lugar o cheiro do seu conhecimento” (II Coríntios 2:14).

Primeiramente a Deus, que me deu forças para cursar esse mestrado. Meu orientador espiritual.

Aos meus pais, Reginaldo Santana e Maria do Socorro, que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas e momentos de afastamento e me mostraram o quanto era importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade no passado. Às minhas irmãs, Sumaya e Rafaelly pelo apoio e incentivo de sempre.

À Dra. Claudia Rohde. Resumir a minha orientadora é muito pouco, para mim ela é um exemplo. É uma imensa honra e orgulho em tê-la como orientadora por mais de três anos (desde a graduação), com inegável e segura orientação.

A todos do Laboratório de Genética do CAV/UFPE, em especial ao grupo da Mutagênese: André Silva, Cícero Verçosa, Érima Amorim, Francisco Carvalho Neto, Gislaine Pereira, Ícaro Castro, Rafaela Alves, pelo apoio mútuo nos experimentos. Aprendemos a trabalhar em grupo, a respeitar o próximo e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir.

À minha turma, PPGSHMA 2016.1, por compartilharem comigo momentos tão intensos de estudo e, principalmente, de descontração. Melhor turma que poderia existir.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao imprescindível apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela oportunidade de concretizar o mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Um agradecimento especial a Bruno Martins, que cedeu seu apartamento para que eu pudesse fazer a exposição dos organismos no centro de Vitória de Santo Antão.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, meus singelos agradecimentos.

RESUMO

Nas últimas décadas diversas metodologias têm sido aplicadas em organismos modelos devido a sua importância como bioindicadores dos efeitos (genotóxicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos) de poluentes ambientais. Este estudo teve como objetivo testar a sensibilidade do organismo modelo *Drosophila melanogaster* à poluição atmosférica associada tanto à urbanização da cidade de Vitória de Santo Antão (centro da cidade e zona rural), quanto à poluição emitida por um aglomerado de três usinas termelétricas, situadas na Área de Proteção Ambiental Aldeia-Beberibe, em Igarassu, Pernambuco. Larvas de *D. melanogaster* foram expostas, por seis dias, nos locais de estudo e os danos genéticos foram investigados por meio da metodologia do ensaio cometa, em cédulas presentes na hemolinfa. Os danos foram classificados em quatro categorias, de zero (sem dano) a quatro (altamente danificado), sendo calculados os Índice de Dano e Frequência de Dano. Os testes foram repetidos em dois anos seguidos. Na cidade de Vitória de Santo Antão, os resultados demonstraram significativos danos genéticos nos organismos submetidos ao ambiente urbano, em comparação ao ambiente rural, e ao grupo controle negativo estabelecido. Houve também significativo aumento dos danos genéticos nos organismos expostos em 2017, em relação a 2015, o que sugere um possível aumento dos níveis de poluição na cidade de Vitória de Santo Antão. Os resultados foram corroborados pela análise de material atmosférico particulado. Na investigação realizada junto às usinas termelétricas, foram investigados cinco locais, distantes da usina em 0,7, 1,0, 1,5, 5,0 e 6,0 km (pontos 1 a 5, respectivamente). Houve danos genéticos significativos apenas nos indivíduos expostos ao local mais próximo das usinas (ponto 1), provavelmente causada pelos poluentes eliminados durante o seu funcionamento, que ocorreu no período de outubro de 2016, e que foi medido em quilowatts de energia. Em outubro do ano seguinte (2017), quando as usinas se encontravam em baixo funcionamento, não houve efeito genotóxico nos organismos expostos. O conjunto dos resultados indica que *D. melanogaster* é adequada ao estudo da poluição atmosférica e no biomonitoramento ambiental. Além disso, os resultados são um alerta para os atuais riscos que a poluição atmosférica pode significar para a saúde humana e para o meio ambiente, nos locais deste estudo.

Palavras-chave: Biomonitoramento ambiental. Poluição urbana. Usinas termelétricas. Pernambuco-Brasil.

ABSTRACT

In the last decades, several methodologies have been applied in model organisms due to their importance as bioindicators of the effects (genotoxic, mutagenic and/or recombinogenic) of environmental pollutants. The objective of this study was to test the sensitivity of the model organism *Drosophila melanogaster* to the atmospheric pollution associated with both the urbanization of the city of Vitória de Santo Antão (city center and rural area) and the pollution emitted by a cluster of three thermoelectric power plants located in Environmental Protection Area Aldeia-Beberibe, in Igarassu, Pernambuco. *Drosophila melanogaster* larvae were exposed for six days at the study sites and genetic damages were investigated using the comet assay methodology using hemolymph cells. The damages were classified into four categories, from zero (no damage) to four (highly damaged), and the Damage Index and Damage Frequency were calculated. The tests were repeated in two consecutive years. In the city of Vitória de Santo Antão, the results showed significant genetic damages in cells of organisms submitted to the urban area, in comparison to the rural and to the negative control group established. There was also a significant increase in genetic damage in organisms exposed in 2017, compared to 2015, which suggests a possible increase in pollution levels in the city of Vitória de Santo Antão, in the last year. The results were corroborated by the analysis of particulate atmospheric material. In the research carried out at thermoelectric plants, five sites were investigated, away from the plants at 0.7, 1.0, 1.5 and 5.0 km (points 1 to 5, respectively). There was significant genetic damage only in those organisms exposed to the site 1 (the closest to the plants), probably caused by the pollutants disposed of during the operation in October 2016. In October of the following year (2017), when the plants were in low functioning, there was no genotoxic effect among the exposed organisms. The set of results indicate that *D. melanogaster* is suitable for the study of atmospheric pollution and to environmental biomonitoring. In addition, the results are a warning for the current risks that air pollution can pose to human health and the environment at the urban and preserved areas studied.

Key-words: Environmental biomonitoring. Urban pollution. Thermoelectric plants. Pernambuco-Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA (Análise de Variância)
- APA (Área de Proteção Ambiental)
- AGV (Amostradores de Grande Volume)
- CO (Monóxido de Carbono)
- *D.* (*Drosophila*)
- DETRAN-PE (Departamento Estadual de Trânsito de Pernambuco)
- DMSO (Dimetil Sulfóxido)
- DNA (Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Desoxyribonucleic Acid*)
- DF% (Frequência de Dano, do inglês *Damage Frequency*)
- EDTA (Ácido Etilenodiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EPA (*Environmental Protection Agency*)
- HC (Hidrocarboneto)
- HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos)
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)
- IARC (International Agency for Research on Cancer)
- ID (Índice de Dano, do inglês *Damage Index*)
- LM (Baixo ponto de fusão, do inglês *Low Melting point*)
- mL (Mililitro)
- µL (Microlitro)
- MP (Material particulado)
- NaCl (Cloreto de Sódio)
- NaOH (Hidróxido de Sódio)
- Na₂HPO₄(Fosfato Dissódico de Potássio)
- PBS (Sulfeto de chumbo (II))
- pH (Potencial de Hidrogênio iônico)
- PTS (Partículas Totais em Suspensão)
- R-CHO (Aldeídos)
- rpm (rotações por minuto)
- rSO_x (Dióxido de Enxofre)
- SMART (Teste de Mutação e Recombinação Somática, do inglês *Somatic Mutation and Recombination Test*)
- UTEs (Usinas Termelétricas)
- V/cm (volume por centímetro)

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1 Aumento anual (de 2007 a 2017) da frota de veículos de Vitória de Santo Antão – PE. Fonte: Adaptado de DETRAN-PE (2018). 7
- Figura 4 Esquema de geração de energia elétrica numa usina termelétrica. Fonte: http://www.ciencias.seed.pr.gov.br/modules/galeria/uploads/4/1116esquema_termoeletrica.jpg. 8
- Figura 3 Amostrador de Grande Volume (AGV) para coleta de partículas totais em suspensão. Fonte: Fabricante Energética 10
- Figura 4 **A.** Esquema da disposição das lâminas na cuba de eletroforese, evidenciando os polos negativo e positivo. **B.** Imagem de um nucleóide em microscópio de fluorescência indicando o sentido da migração do DNA fragmentado. Fonte: Santana (2015). 11
- Figura 5 Adultos de *Drosophila melanogaster*, a esquerda a fêmea e a direita o macho, que é um pouco menor e possui o pente sexual (indicado pela seta). Fonte: Saturnino (2012). 12

Artigo 1

- Fig 1 Location of the municipality of Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil. 17
- Fig 2 Population box built to expose drosophilids in the environments investigated. The box was made of a transparent polyethylene terephthalate, fine screen, a protection cover, and containing cultivation medium (Verçosa et al., 2015). 18
- Fig 3 The five levels of genetic damage (0 to 4) based on length and amount of DNA in comet tails. The images were using hemocytes collected from *D. melanogaster* larvae stained with GelRed™ under fluorescent microscopy. Figure from Verçosa et al. (2017) with permission. 20
- Fig 4 Mean Damage Index (DI) in hemocytes of *D. melanogaster* Oregon-R larvae ($n = 3$ for each one). Vertical bars indicate standard deviation. Letters a, b and c on the top of columns indicated statistically significant differences in that studied groups which have different letters, in the Bonferroni post-hoc analysis ($P < 0.05$). 22
- Fig 5 Mean Damage Frequency (DF%) in hemocytes of *D. melanogaster* Oregon-R larvae ($n = 3$ for each one). Vertical bars indicate standard deviation. Letters a and b on the top of columns indicated statistically significant differences in that studied groups which have different letters, in the Bonferroni post-hoc analysis ($P < 0.05$). 22
- Fig 6 Qualitative analysis of Particulate Material (MP) filters during the exposure period in the city center of Vitória de Santo Antão (urban area) and in the rural area. 23

Artigo 2

- Figura 1 **A.** Imagem aérea do conjunto de três usinas Termelétricas com indicação do ponto 1 de exposição dos drosofilídeos. **B.** Indicação dos cinco pontos de exposição dos drosofilídeos (pontos 1 a 5). O círculo amarelo indica o conjunto de usinas termelétricas. Fonte: Google Earth. 32

Figura 2	Índice de Dano dos grupos estudados de <i>Drosophila melanogaster</i> (2016 e 2017).	34
Figura 3	Frequência de Dano (DF%) dos grupos estudados de <i>Drosophila melanogaster</i> (2016 e 2017).	34
Figura 4	Meses do ano (novembro de 2015 a setembro de 2016) e média da produção mensal (em kW) das três termelétricas juntas (Pau Ferro I, Termomanaus e Pernambuco III). A seta azul indica o período de realização dos experimentos (pontos 1 a 5).	36
Figura 5	Meses do ano (novembro de 2016 a setembro de 2017) e média da produção mensal (em kW) das três termelétricas juntas (Pau Ferro I, Termomanaus e Pernambuco III). A seta azul indica o período de realização dos experimentos (pontos 1 a 3).	36

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1	Métodos de medição dos parâmetros (ou equivalentes) segundo Resolução CONAMA Nº 03 de 28.06.90.	09
----------	---	----

Artigo 1

Tabela 1	Evaluation of genetic damage in larvae of <i>Drosophila melanogaster</i> Oregon-R exposed to negative environmental control (Catimbau National Park), negative control (laboratory), and rural and urban areas in Vitória de Santo Antão.	21
Tabela 2	Bonferroni post-hoc analysis of Damage Index (below the diagonal) and Damage Frequency (above the diagonal) among <i>Drosophila melanogaster</i> groups.	23

Artigo 2

Tabela 1	Avaliação do dano genético em células somáticas de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> expostas a diferentes distâncias das usinas termétricas (0,7, 1,0, 1,5, 5,0 e 6,0 km), situadas no município de Igarassu, Pernambuco, Brasil, e grupo controle negativo.	33
Tabela 2	Análise estatística (<i>post-test</i> de Bonferroni) entre os valores de Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) nos grupos tratados e controle negativo, em dois anos consecutivos de estudo (2016 e 2017).	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 O efeito genotóxico dos poluentes atmosféricos	16
3.2 Poluição atmosférica em centros urbanos	17
3.3 Termelétricas e impactos ambientais	19
3.4 Análise de material particulado na atmosfera	20
3.5 O ensaio cometa para investigação da genotoxicidade	22
3.6 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	23
4. Artigo 1: <i>Drosophila melanogaster</i> as model organism for analyzing genotoxicity associated with atmospheric pollution in Pernambuco, Brazil.....	26
5. Artigo 2: Avaliação do risco genotóxico ambiental associado à três usinas termelétricas na Área de Proteção Ambiental Aldeia-Beberibe (Nordeste do Brasil).	42
6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, a população vem demonstrando preocupação em relação aos efeitos impróprios à saúde causados pela exposição a poluentes atmosféricos. Estes poluentes podem ser quaisquer substâncias lançadas na atmosfera em quantidades consideravelmente altas, com capacidade para causar efeitos mensuráveis nos seres vivos, que possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, e danoso à fauna, flora e ao meio físico (PEDROSO, 2007). O risco decorrente da exposição aos poluentes atmosféricos ainda não é completamente conhecido, mas estudos epidemiológicos mostram correlações significativas entre diferentes níveis de poluição do ar e os efeitos agudos e crônicos na saúde humana e dos organismos vivos (WILSON et al., 2004). Um dado importante é que a poluição do ar pode provocar mudanças anatômicas, comportamentais, bioquímicas e fisiológicas na população (MAIOLI et al. 2008), além de afetar os níveis de diversidade biológica nos ambientes, por afetar também outros organismos no local afetado (HYUN-JEONG et al., 2017).

Poluentes atmosféricos são emitidos de várias fontes, como automóveis, fábricas, usinas termelétricas entre outros, sendo capazes de modificar o material genético dos organismos vivos, atuando como agentes genotóxicos (GARCIA et al. 2012; RAINHO et al. 2016). Esta genotoxicidade está relacionada ao potencial que agentes físicos ou químicos possuem de induzir alterações no material genético de células somáticas, e que podem se constituir em mutações capazes de ser transmitidas às gerações futuras (SILVA et al., 2000). Tais agentes podem interferir direta e indiretamente na vida dos diversos animais expostos, como peixes, anfíbios e os mais variados artrópodes, como por exemplo, o inseto díptero *Drosophila melanogaster* (EOM et al., 2017).

Drosophila melanogaster é uma pequena mosca da família Drosophilidae (FREIRE-MAIA; PAVAN, 1949) que apresenta grandes vantagens para variados testes biológicas devido a seu rápido ciclo de vida, grande quantidade de informações sobre seu genoma, fácil manipulação laboratorial, pouca exigência nutritiva e baixo custo de manutenção (OLIVEIRA et al., 2007). Esta espécie também tem sido muito utilizada como modelo-biológico para avaliar o efeito tóxico-genético de substâncias nocivas ao genoma, em ensaios *in vivo* e *in vitro*, sendo o Ensaio Cometa um dos métodos mais recentes nos estudos. Em consideração a essas características, *D. melanogaster* é cada vez mais vista como um organismo alternativo ao uso de pequenos mamíferos em testes experimentais (SIDDIQUE et al., 2005), e cada vez mais requisitada em testes de genotoxicidade (GAIVÃO; SIERRA, 2014).

Entender como contaminantes afetam os parâmetros genéticos populacionais pode oferecer informações importantes sobre as consequências da exposição no nível da população das espécies analisadas (MUSSALI-GALANTE et al., 2014). Isso porque a liberação de gases e poluentes é capaz de danificar o material genético de organismos expostos. Esses compostos podem agir como agentes patológicos respiratórios e cardíacos e, até mesmo, como agentes carcinogênicos e genotóxicos para a população humana e outros organismos (OHE et al., 2004; SILVA et al., 2013; GÓMEZ-ARROIOZ et al., 2018).

Frente a essa problemática, é necessário e urgente implementar novas abordagens para o estudo da genotoxicidade associada à poluição atmosférica, a fim de viabilizar uma rápida e qualificada caracterização destas alterações no material genético, como é o caso do Ensaio Cometa no organismo-modelo *D. melanogaster*. Da mesma forma, é importante iniciar um estudo de biomonitoramento ambiental de centros urbanos em expansão - como é o caso da cidade de Vitória de Santo Antão - e também de locais relevantes para a preservação ambiental, como a Área de Proteção Ambiental (APA) Aldeia Beberibe, situada na Região Metropolitana do Recife, em Pernambuco.

Sendo assim, este trabalho pretende ser o início de uma investigação dos riscos genotóxicos associados à poluição atmosférica, e servir de suporte científico para que ocorram controles rígidos da produção e liberação de poluentes atmosféricos nos locais do estudo, e que visem a melhoria na qualidade de vida da população humana, e do meio ambiente.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito genotóxico promovido pela poluição atmosférica após exposição do organismo modelo *Drosophila melanogaster* aos ambientes rural e urbano do município de Vitória de Santo Antão, e aos arredores de três usinas termelétricas, em Igarassu, Pernambuco.

Objetivos específicos

- ✓ Investigar os efeitos genotóxicos da poluição atmosférica no ambiente urbano e rural do município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, em células somáticas da hemolinfa de larvas de *Drosophila melanogaster*;
- ✓ Realizar medidas de material particulado nas zonas rural e urbana de Vitória de Santo Antão;
- ✓ Investigar os efeitos genotóxicos da poluição atmosférica emitidos por um conglomerado de três usinas termelétricas situadas em Igarassu, Pernambuco, em células da hemolinfa de larvas de *Drosophila melanogaster*;
- ✓ Analisar os efeitos genotóxicos associados à poluição atmosférica dos locais deste estudo, em dois anos distintos;
- ✓ Estabelecer um grupo controle negativo de *D. melanogaster* para os estudos comparativos do efeito genotóxico da poluição atmosférica;
- ✓ Divulgar as informações obtidas a fim de alertar a população e trabalhadores locais para os possíveis riscos à saúde humana e ambiental, promovendo assim uma tomada de decisão para um maior controle dos possíveis poluentes atmosféricos e uso de fontes alternativas de energia limpa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A diminuição da qualidade do ar nos grandes centros urbanos tem despertado o interesse da comunidade científica para encontrar mecanismos de monitoração dos poluentes atmosféricos. Para compreender os processos de emissão e contaminação da atmosfera é importante monitorar suas fontes, buscando identificar os elementos químicos emitidos por meio das atividades industriais, transportes e geração de energia (SOUZA et al., 2010).

As fontes mais comuns de poluentes atmosféricos são as automotivas, as industriais e as agrícolas (LIMA, 2007). O monitoramento sistemático das concentrações de poluentes presentes na atmosfera (qualidade do ar) é fundamental para garantir a qualidade de vida existente no local. Segundo Smodis e Bleise (2002) a monitoração da qualidade do ar pode ser realizada pelo uso de biomarcadores ou pela coleta de material particulado em suspensão, precipitação e monitoração instrumental.

3.1 O efeito genotóxico dos poluentes atmosféricos

Entende-se como agente genotóxico, aquele que tem a capacidade de alterar o material genético dos organismos expostos, causando alguma lesão ou alteração da integridade do material genético (DNA), sendo que estas lesões podem ser ou não corrigidas pelo mecanismo de reparo celular. No entanto, um agente é considerado carcinogênico quando é capaz de estimular o aparecimento de câncer através das alterações causadas em genes particulares, e é transmitido à geração de descendentes celulares (CIVETTA; CIVETTA, 2011).

Diversos agentes são capazes de lesionar o material genético, entre eles pode-se citar os compostos metálicos, materiais particulados e os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (IARC, 1983; LEMOS et al., 2012). Esses poluentes oferecem risco genotóxico aos organismos em geral, podendo elevar o índice de doenças respiratórias e outros problemas de saúde em populações humanas, como também aos organismos que estão constantemente em contato com esses poluentes. A liberação dos poluentes pode ser feita através de veículos motorizados, chaminé das indústrias, usinas termelétricas, entre outras. Adicionalmente, esses agentes são capazes de induzir alterações graves no ambiente e nos fatores bióticos e abióticos, em grande escala de velocidade.

A queima de combustíveis fósseis e atividades industriais geram materiais particulados e diversos poluentes atmosféricos - como monóxido de carbono, dióxidos de enxofre - que

podem impactar a qualidade de vida da população, principalmente o sistema respiratório, devido à inalação destes poluentes (CANSARAN-DUMAN, 2011).

Mesmo em baixas concentrações, os poluentes atmosféricos são capazes de causar efeitos à saúde humana (GAVINIER; NASCIMENTO, 2014) e modificar o material genético dos organismos, sendo este efeito genotóxico a origem de diversas reações biológicas prejudiciais, tais como inibição do crescimento, perturbação na reprodução, ou até mesmo surgimento de tumores (OHE et al., 2004).

A literatura biomédica está repleta de estudos sobre os efeitos agudos da poluição do ar sobre a saúde humana (MARCÍLIO; GOLVEIA, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; ROMÃO et al., 2013). Estudos apontam que os mais afetados pela baixa qualidade do ar são as crianças, os idosos e as pessoas com problemas respiratórios (SILVA et al. 2013), pois o ar poluído penetra nos pulmões, ocasionando o aparecimento de várias doenças como bronquite, asma, alergias e câncer pulmonar (OMS, 2000). Encontram-se associações cientificamente comprovadas da relação do aumento do material particulado no ar com o aumento de doenças respiratórias em crianças (CEZAR, 2013) menores de 5 anos, e com o aumento de doenças cardiovasculares em maiores de 39 anos (NARDOCCI et al., 2013). Além disso, a poluição ocasiona também alterações e mudanças no sistema imunológico das pessoas, sendo elas adultas, crianças ou idosos (MARTINS, 2002). Já foi comprovado que existe forte associação de material particulado inalável com o incremento de 4,6% nas internações por asma em crianças, de 4,3% por doença pulmonar obstrutiva crônica em idosos, e por 1,5% por doença isquêmica do coração, também em idosos (GOUVEIA et al., 2006). Por fim, estudos vêm sendo realizados para comprovação da relação da poluição atmosférica com efeitos nocivos à função reprodutiva, em relação à fertilidade e à saúde fetal, evidenciando que os poluentes atmosféricos podem retardar o crescimento intrauterino, provocar morte neonatal e reduzir a fertilidade masculina e feminina (VERAS et al., 2010).

3.2. Poluição atmosférica em centros urbanos

Os poluentes atmosféricos podem se originar de fontes naturais como também de fontes antropogênicas. Centros urbanos geralmente reúnem uma grande frota de veículos automotores, o que torna a poluição antropogênica significativamente maior que do que a natural nesses locais (WATSON et al., 2001).

As fontes emissoras antropogênicas são classificadas em móveis ou estacionárias. As fontes estacionárias estão associadas a processos da produção industrial e usinas

termelétricas, já as fontes móveis, são representadas, principalmente, pelos veículos automotores (CARNEIRO, 2004).

Um dos maiores geradores de poluição atmosférica nos centros urbanos que encontramos hoje são atividades industriais e os meios de transporte que circulam pela cidade, como veículos de passageiros, veículos comerciais e frota pesada (CESAR et al., 2013). De acordo com Molnar et al. (2002), os principais compostos emitidos pelos escapamentos dos veículos são a água (H₂O), o monóxido de carbono (CO), os hidrocarbonetos parcialmente oxidados ou não oxidados (HC), os aldeídos (R-CHO), os óxidos de nitrogênio (NO_x), os óxidos de enxofre (SO_x) e o material particulado (carbono orgânico e inorgânico, cobre, ferro e zinco).

Os veículos se tornaram um dos agravantes na degradação da qualidade do ar atmosférico, especialmente nas metrópoles, capitais e áreas com grandes centros urbanos (TEIXEIRA et al., 2008). No Brasil, não só estes locais sofrem com a poluição atmosférica, mas também as cidades do interior, como é o caso do município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Este local sofreu um elevado aumento do investimento industrial, imobiliário e crescimento populacional entre 2006 e 2017 (NORONHA, 2013), tendo, em 2016, uma população estimada em 136.706 habitantes (IBGE, 2016).

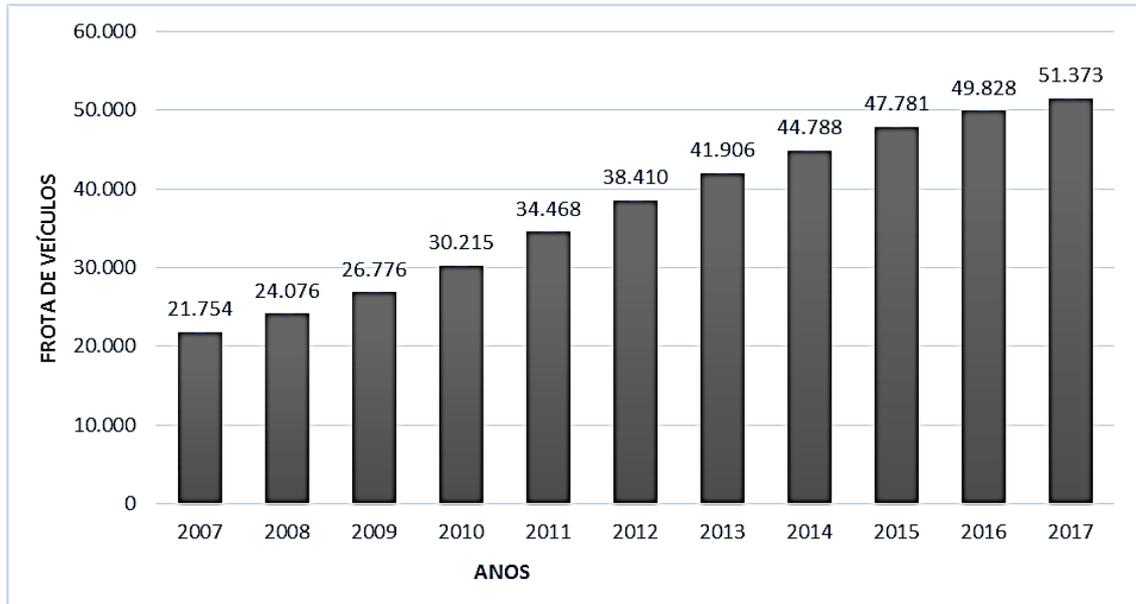
As principais fontes de emissão de poluentes no município de Vitória de Santo Antão são as fontes móveis (frota de veículos). Segundo dados do Departamento Estadual de Trânsito de Pernambuco (DETRAN-PE, 2018), no período de 2007 a 2017, a frota de veículos do município cresceu 136% (**Figura 1**). Segundo a Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental (BRASIL, 2014), os veículos privados das cidades brasileiras com mais de 60.000 habitantes são responsáveis por 80% da emissão de poluentes por fontes móveis. Nessas cidades, os automóveis e as motocicletas emitem 4,9 vezes mais poluentes do que os veículos destinados aos transportes públicos.

Apesar da importância do conhecimento acerca da composição de poluentes na atmosfera urbana, existem poucos estudos dedicados a esse problema no Brasil. Como agravante está o fato de que a maioria dos municípios brasileiros de porte médio não possuem sequer estações de monitoramento do ar (ANGEOLETTO et al., 2016). Medir a poluição atmosférica seria de grande importância para o estabelecimento de padrões adequados de qualidade ambiental urbana nas cidades brasileiras (LEANDRO; ANGEOLETTO, 2017).

Diante disso, se faz necessário desenvolver tecnologias eficientes no controle da emissão de gases, que facilitem a aferição dos dados, como também aprimorar as legislações

vigentes, pois muitos parâmetros de qualidade do ar estão desatualizados (BERNARDO et al., 2014).

Figura 1. Aumento anual (de 2007 a 2017) da frota de veículos de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.



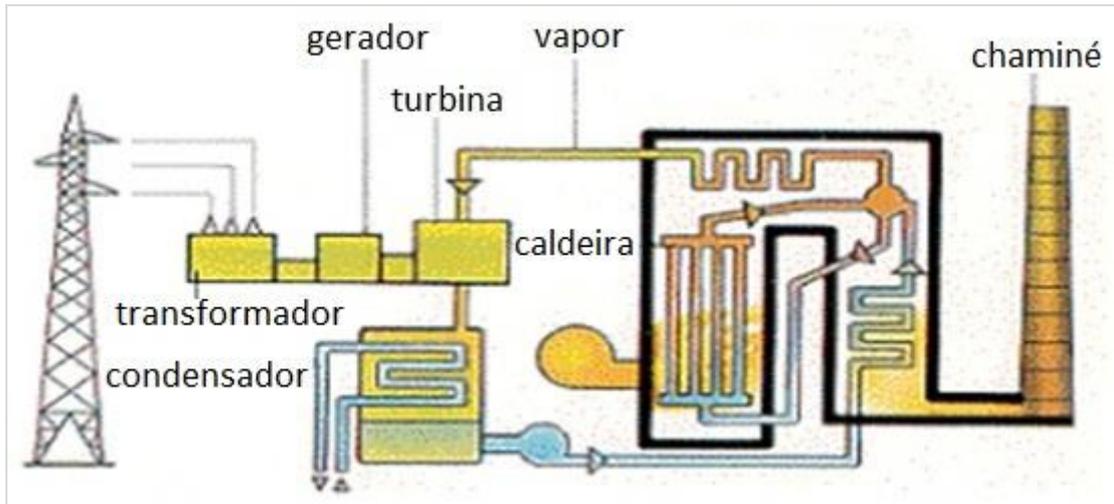
Fonte: Adaptado de DETRAN-PE (2018).

3.3 Termelétricas e impactos ambientais

Embora as hidrelétricas ainda sejam a principal fonte de geração de energia elétrica no Brasil, as termelétricas têm sido muito utilizadas nos últimos anos como alternativa suplementar energética aos fenômenos de falta de chuvas e ao esgotamento dos reservatórios de água em variadas regiões, especialmente no Nordeste do Brasil (IEMA, 2016). A energia das termelétricas é garantida, sob o aspecto de que não depende de fatores climáticos, embora sua produção seja mais cara e mais poluente do que a energia produzida por hidrelétricas.

As termelétricas obtêm energia a partir da queima em caldeira de carvão, ou de óleo combustível ou de gás natural. Em uma termelétrica convencional, o calor produzido pela queima dos combustíveis em caldeira aquece a água que circula uma rede de tubos, produzindo vapor (**Figura 2**). Este vapor movimenta as pás de uma turbina, que ligada a um gerador, produz energia elétrica. O vapor é resfriado por um condensador e volta à rede de tubos da caldeira, reiniciando o ciclo (IEMA, 2016).

Figura 2. Esquema de geração de energia elétrica numa usina termelétrica.



Fonte: http://www.ciencias.seed.pr.gov.br/modules/galeria/uploads/4/1116esquema_termoeletrica.jpg

O Brasil ingressou no ramo das termelétricas em 1883 e conta hoje com aproximadamente 3.000 usinas que, juntas, fornecem cerca de 25% da energia elétrica total do país (ANEEL, 2018). Nas áreas que estão instaladas, as termelétricas causam grande impacto ambiental, pois a queima de combustível para obtenção de energia produz gases, muitos deles nocivos e com papel relevante na produção do efeito estufa. São produzidos óxidos e dióxidos de enxofre, óxidos de nitrogênio, monóxido e dióxido de carbono, além de particulados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (IEMA, 2016). Tais substâncias podem atuar como agentes genotóxicos e/ou mutagênicos, causando danos à saúde humana e aos demais organismos (GARCIA et al. 2012).

3.4 Análise de material particulado na atmosfera

As partículas em suspensão podem ser classificadas como primárias e secundárias. As primárias se originam da combustão de veículos e da suspensão de poeira (os materiais particulados, dióxido de enxofre, monóxido de carbono, óxidos de nitrogênio e hidrocarbonetos). As secundárias se referem aos gases da combustão, que reagem com o vapor de água na atmosfera (o ozônio e o trióxido de enxofre).

Dentre os principais poluentes, o material particulado (MP) é o que apresenta maior toxicidade (ARBEX et al., 2004). O MP é uma complexa mistura de partículas sólidas e líquidas, podendo ser formadas por produtos químicos orgânicos, metais, partículas do solo ou poeira (EPA, 2015). O material particulado está representado pelos materiais totais em suspensão (PTS) que podem variar de 0,002 μm a 100 μm . Segundo a EPA (2017), o material particulado pode ser dividido em duas categorias. O $\text{PM}_{2,5}$ é formado por partículas

cujo tamanho chega até 2,5 μm , pode ser encontrado em nevoeiros e na fumaça. No entanto, o PM_{10} , com partículas de tamanho entre 2,5 e 10 μm , pode ser encontrado em regiões próximas a indústrias.

A escolha dos monitores de poluição deve levar em consideração, além dos padrões legais, os recursos necessários para a aquisição, operação e manutenção dos equipamentos. Várias metodologias e equipamentos foram desenvolvidos para detectar a quantidade de material particulado presentes no ar atmosférico. De acordo com a Resolução CONAMA Nº 03/90 constitui-se um dos Métodos de Referência (Medição) aprovados pelo INMETRO (**Tabela 1**).

Tabela 1. Métodos de medição dos parâmetros (ou equivalentes) segundo Resolução CONAMA Nº 03 de 28.06.90.

PARÂMETROS	UNIDADE	MÉTODO DE MEDIÇÃO
Partículas totais em Suspensão	$\mu\text{g}/\text{m}^3$ - 24h	Amostrador de grandes volumes
Partículas inaláveis	$\mu\text{g}/\text{m}^3$ - 24h	Separação Inercial/Filtração
Fumaça	$\mu\text{g}/\text{m}^3$ - 24h	Refletância
Dióxido de Enxofre	$\mu\text{g}/\text{m}^3$ - 24h	Peróxido de Hidrogênio
Dióxido de Nitrogênio	$\mu\text{g}/\text{m}^3$ - 1h	Quimiluminescência
Monóxido de Carbono	ppm - 8h	Infravermelho não dispersivo
Ozônio	$\mu\text{g}/\text{m}^3$ - 1h	Quimiluminescência

Fonte: CONAMA N.3 de 28.06.90.

Para análise e coleta de Partículas Totais em Suspensão (PTS) no ar ambiente, (metodologia utilizada neste trabalho) utiliza-se o Amostrador de Grande Volume (AGV) (**Figura 3**). O AGV suga uma certa quantidade de ar através para um filtro, instalado dentro de uma casinhola de abrigo, através de uma bomba. A vazão imprimida pelo amostrador e a geometria do abrigo favorecem a coleta de partículas de 25-50 μm (diâmetro aerodinâmico), dependendo da velocidade e da direção do vento. O volume de ar amostrado é determinado a partir da vazão medida e do tempo de amostragem. Tem-se então a concentração das partículas totais em suspensão (PTS), em $\mu\text{g}/\text{m}^3$, obtida dividindo-se a massa de partículas coletada pelo volume de ar amostrado. Uma das análises que pode ser feita é pesar o filtro antes e depois da amostragem.

Figura 3. Amostrador de Grande Volume (AGV) para coleta de partículas totais em suspensão.



Fonte: Fabricante Energética

3.5 O ensaio cometa para investigação da genotoxicidade

Devido à grande preocupação em analisar os efeitos genotóxicos produzidos pela poluição atmosférica, metodologias que utilizam biomarcadores de dano do DNA foram desenvolvidas em estudos com diversos organismos-modelos. Tais estudos podem servir de sinais precoces ao risco de alteração do DNA (SILVA et al., 2000; BARSINIÉ et al., 2012) e dos impactos individuais que a poluição pode causar aos organismos. Entre os testes de genotoxicidade podemos destacar o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART), o teste de micronúcleo, e o ensaio cometa.

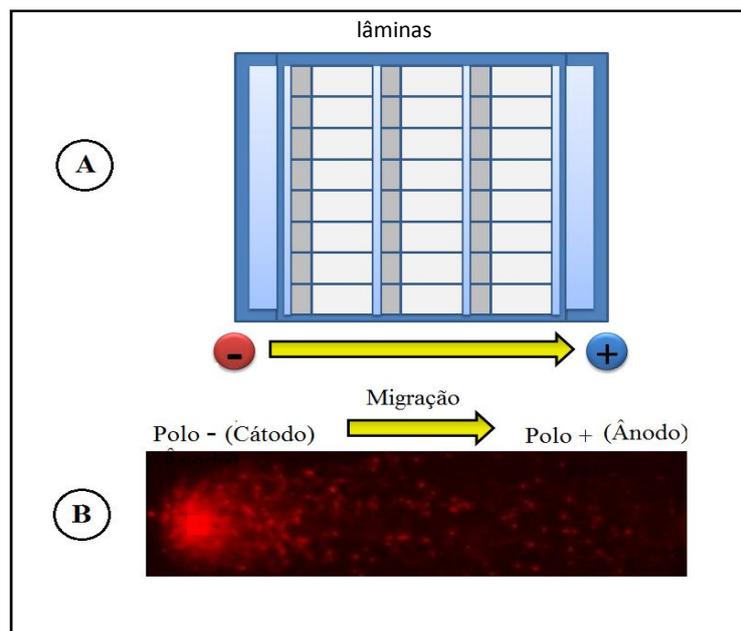
O ensaio cometa é um teste de genotoxicidade revelado por meio da eletroforese em agarose em meio alcalino, que foi descrito primeiramente por Ostling e Johanson (1984), e modificado por Singh et al. (1988). É um método rápido, muito sensível e de baixo custo (BELPAEME et al., 1998; COLLINS et al., 2008) que permite detectar danos ao material genético em células individuais, em diferentes grupos animais, como mamíferos, humanos (GODSCHALK et al., 2013; COLLINS et al., 2014), peixes e artrópodes, como a *Drosophila melanogaster* (GAIVÃO; SIERRA, 2014; VERÇOSA et al. 2017).

Para a execução deste método, as células dos organismos expostos são incorporadas a uma lâmina com fina camada de agarose e submetidas a uma solução de lise (para remoção de histonas), de forma que o DNA ocupará todo o espaço celular, assumindo a forma de um

nucleóide (UMBUZEIRO et al., 2006). Na etapa de eletroforese, o DNA fragmentado do nucleóide migra em direção ao ânodo (polo positivo), formando uma cauda que lembra a ligeiramente um cometa (**Figura 4**). Quanto maior o número de danos ao DNA, mais rápida e mais longa será a migração da cauda (cometa) (AZQUETA; COLLINS, 2013).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa implementou a metodologia do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* (VERÇOSA et al., 2017) investigando o efeito genotóxico da radiação natural neste organismo (VERÇOSA, 2015; CASTRO, 2016) e pela poluição atmosférica presente em centros urbanos (SANTANA, 2015; VERÇOSA, 2015). Por outro lado, o teste também tem sido aplicado para garantir a segurança do uso de compostos líquênicos (AMORIM, 2016); compostos pirimidínicos (SILVA, 2012; SILVA, 2016), e de substâncias utilizadas como larvicidas no controle de espécies de mosquitos em Pernambuco.

Figura 4. **A.** Esquema da disposição das lâminas na cuba de eletroforese, evidenciando os polos negativo e positivo. **B.** Imagem de um nucleóide em microscópio de fluorescência indicando o sentido da migração do DNA fragmentado.



Fonte: Santana (2015).

3.6 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

O organismo-modelo *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (**Figura 5**), naturalmente se encontra em volta das frutas em putrefação, por isso é conhecido também como mosca da fruta. Essa espécie tem ocorrência em diversos ecossistemas do mundo (BÄCHLI, 2017), inclusive no ambiente doméstico onde foi introduzida e transportada pelo

homem para diversos ambientes (DAVID; CAPY, 1988). O seu genoma encontra-se distribuído em 8 cromossomos, sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual (XX ou XY) (JOHNSTON, 2002) que, no total, contêm aproximadamente 13.600 genes, sendo praticamente a metade do número de genes conhecidos em humanos (ADAMS et al., 2000). Normalmente os adultos maduros apresentam uma cor castanho-amarelada, tendo pequenas dimensões, com cerca de 3 milímetros de comprimento e 2 milímetros de largura. Os machos e fêmeas podem ser facilmente identificados, pois além da fêmea ser ligeiramente maior que o macho, estes possuem o “pente sexual” (**Figura 5**) estrutura exclusiva dos machos, situada no primeiro par de patas (REEVE, 2001).

Figura 5. Adultos de *Drosophila melanogaster*, a esquerda a fêmea e a direita o macho, que é um pouco menor e possui o pente sexual (indicado pela seta).



Fonte: Saturnino (2012).

Utilizada por mais de um século para estudos genéticos, desde os trabalhos do cientista norte-americano Thomas Morgan, no ano de 1910, *D. melanogaster* se tornou modelo experimental essencial em pesquisas na área da Genética. Em um pouco mais de um século, esta espécie foi alvo de investigações em mais de 100.000 artigos científicos (VENTUROLI, 2005; GILBERT, 2008). Segundo Nepomuceno (2015), há mais de 50 anos *D. melanogaster* vem sendo utilizada em pesquisas científicas que visam monitorar danos causados ao DNA por agentes químicos.

É um organismo bastante empregado nas mais diversas investigações e cada vez mais utilizada para o estudo de doenças humanas (REDLARSKI et al., 2015). Isso se deve ao fato de *D. melanogaster* compartilhar mecanismos moleculares básicos com os dos mamíferos, o que permite certo grau de extrapolação para seres humanos (GRAF, 1994), como os que são desencadeados em doenças neurodegenerativas e metabólicas (LENZ et al., 2013). Devido a

essas similaridades pode fornecer respostas relevantes para os seres humanos, com alto grau de acerto.

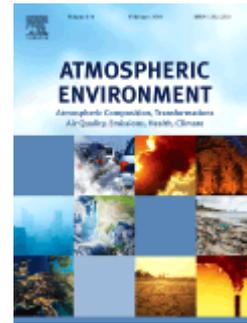
É um organismo teste muito utilizado pelos pesquisadores por apresentar um rápido ciclo de vida, e fornecer um amplo número de indivíduos por progênie, baixo custo de manutenção em laboratório (GREENSPAN, 2004), facilidade na manipulação e na detecção de fenótipos (RAND,2010).

Considerada como organismo alternativo em pesquisa científica, drosofilídeos têm sido recomendados pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos – ECVAM (FESTING et al., 1998; BENFORT et al., 2000), com o objetivo de minimizar o número de mamíferos, como ratos e camundongos, em testes toxicológicos, solucionando impasses envolvendo questões da bioética (SIDDIQUE et al., 2005, DOKE; DHAWALE, 2015).

4. ARTIGO 1

A ser submetido para ***Atmospheric Environment***

A2 (Biodiversidade), Fator de Impacto: 3,629



***Drosophila melanogaster* as model organism for analyzing genotoxicity associated with atmospheric pollution in Pernambuco, Brazil**

Samuel Lima de Santana^{a,b}, Cícero Jorge Verçosa^b, Ícaro Fillipe de Araújo Castro^b, Érima Maria de Amorim^b, André Severino da Silva^b, Thiago Moura da Rocha Bastos^c, Luiz Joaquim da Silva Neto^c, Thiago Oliveira dos Santos^c, Elvis Joacir de França^c, Claudia Rohde^b

^a Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

^b Laboratório de Genética, CAV-UFPE, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

^c Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Corresponding author: Claudia Rohde. Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bairro Bela Vista, CEP 51608-680, Vitoria de Santo Antão, Pernambuco, Brasil, e-mail claudia.rohde@yahoo.com.br Telephone: +55 81 3114.4100.

ABSTRACT

This study evaluated the genotoxic potential of atmospheric pollution associated with urbanization using the model organism *Drosophila melanogaster* and the Comet assay. Larvae were exposed to atmospheric compounds an urban and a rural area in the municipality of Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil for six days (from the embryo stage to the third larval stage) in April 2015 and April 2017. The results were compared to a negative environmental control group exposed to a preserved area (Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil) and to a negative control exposed to the laboratory conditions. The results of the Comet assay with hemolymph demonstrated significant genetic damage in the

organisms exposed to the urban area compared with those exposed to the rural area and to the laboratory conditions. The results confirm previous findings that suggest *D. melanogaster* is the ideal bioindicator organism to monitor genotoxic hazard associated with atmospheric pollution. This is the first study in a series to be carried out to biomonitor the municipality of Vitória de Santo Antão in the development of a map of atmospheric pollution and the awareness effort to shed light on the risks to human health and environment.

Keywords: Environmental genotoxicity, hemocytes, air pollution

1. Introduction

In the past 200 years, anthropic activities such as toxic gas and pollution emissions by industries and fossil fuel vehicles have triggered unseen changes in the environment. Due to the emissions of a large number of pollutants, the composition of the Earth's atmosphere changes continually, and the outcomes of these changes to humans and ecosystems are only partly known today (Nehr et al., 2017). Together with the exponential growth of populations in urban centers, the industrial expansion as recorded in recent decades have increased atmospheric pollution, affecting air quality (Bajpayee and Dhawan, 2014).

From the environmental standpoint, the most important atmospheric pollutants released by industries and fossil fuel vehicles are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), metallic compounds, and particulate matter (IARC, 1983; Lemos et al., 2012). Even very small amounts of these pollutants may affect DNA, posing a considerable health hazard. In addition, these contaminants may trigger a chain of deleterious biological events in human populations, such as reproduction dysfunctions, growth inhibition, loss of or decreased enzyme functions, and tumorigenesis (Ohe et al., 2004).

The municipality of Vitória de Santo Antão, state of Pernambuco, Brazil, which was chosen as study site in this research, was subject to a marked increase in industrial, real estate, and populational growth in the past 10 years (Noronha, 2013). This may have resulted in massive amounts of carbon monoxide, organovolatile compounds, organometallic compounds, and other contaminants being released in the atmosphere. Despite the current scenario, atmospheric pollution in the area has not been properly characterized, and no systematic control measures have been put in place. In this sense, efforts towards atmospheric quality monitoring that also afford to evaluate the effects of pollutants using *in vivo* assays such as genotoxicity, for instance, play a key part in research and in the development of measures to prevent physiological changes caused by environmental pollution.

Several biomarkers have been developed as means to reveal the genotoxic and/or mutagenic potential of atmospheric pollutants associated with urbanization to cause deoxyribonucleic acid (DNA) damage (Feretti et al., 2014; Møller et al., 2015; Imanikia et al., 2016). One of these methodologies includes the Comet assay (Ostling and Johanson, 1984), which is used with different kinds of cells and bioindicator organisms such as *Drosophila melanogaster* (Peraza-Vega et al., 2016; Moraes-Filho et al., 2017; Verçosa et al., 2017). This model organism has been widely used in genotoxicity investigations (Gaivão and Sierra, 2014; Verçosa et al., 2017) and studies on pathological processes (Redlarski et al., 2015) because it shares basic molecular mechanisms, such as those triggered during neurodegenerative and metabolic diseases in humans (Lenz et al., 2013).

According to Nandhakumar et al. (2011), detection of DNA damage at the level of an individual eukaryotic cell warrants high significance in the fields of toxicology, pharmaceuticals, genotoxicity testing, environmental and human monitoring, diagnosis of genetic disorders, for example. In view of the damage caused by pollution, the present study evaluated the genotoxicity associated with atmospheric pollution using the Comet assay, generating new and relevant data about the biomonitoring of atmospheric pollution in urban environments.

2. Materials and methods

2.1 Study site

This study was carried out in the municipality of Vitória de Santo Antão (Fig. 1), 55 km away from Recife, the capital city of the state of Pernambuco, Brazil. Covering 372,637 km², Vitória de Santo Antão is located in a mesoregion called “Zona da Mata”. According to the last census conducted in Brazil (IBGE, 2016), the city’s population is estimated at 136,706 inhabitants with 87.2% of them living in the urban area (5,717 km²).

Two sites of Vitória de Santo Antão were surveyed (*rural area* and *urban area*), in 2015 and 2017. The rural area was located in the Sítio Lagoa de Cabaço, in the farming belt of Vitória de Santo Antão, six kilometers from downtown, at 183 m a.s.l. (08°06’55.1”S, 35°20’11.5”W). It is a private property used for subsistence agriculture which included a farmhouse. In this rural area, Adult *Drosophila melanogaster* Oregon-R individuals were exposed between 13 and 19 April 2015 and between 7 and 12 April 2017. The urban area surveyed was located in 444 Mariana Amália Avenue, downtown Vitória de Santo Antão, at 146 m a.s.l. (08°07’17.3”S, 35°17’41.1”W), which is exposed to intense vehicular traffic. In this place, the drosophilids were exposed between 25 April and 1 May 2015 and between 07 and 12 April 2017.

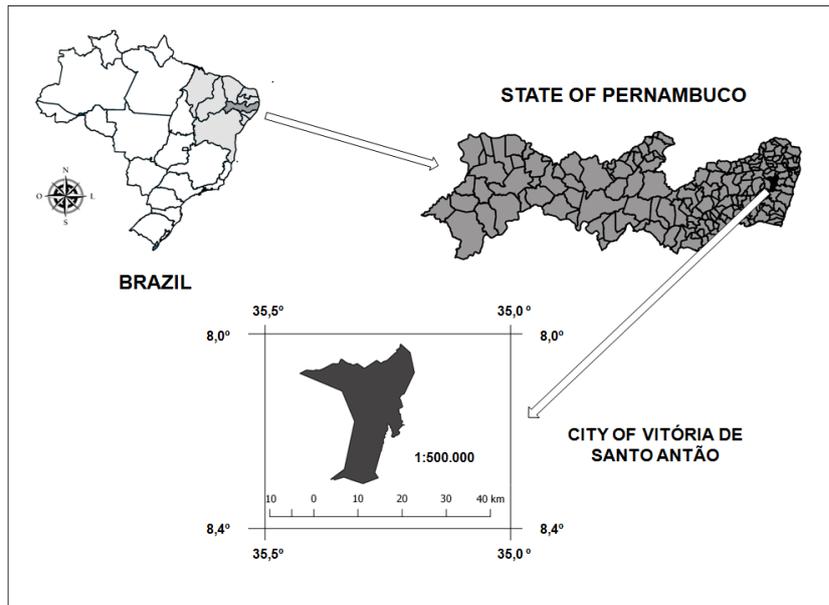


Fig. 1. Location of the municipality of Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.

As negative control, two experiments were carried out. The first used organisms exposed in a conservation area in the Catimbau National Park (Buíque municipality, Pernambuco state). It is a natural environment free of atmospheric pollution situated 242 km west of Vitória de Santo Antão in the mesoregion called Agreste, in Pernambuco state, at 798 m a.s.l. ($08^{\circ}24'00''\text{S}$, $37^{\circ}09'30''\text{W}$). This national conservation unit is the only national park in Pernambuco state, located in the continental area. *Drosophilids* were exposed to Catimbau between 13 and 19 April 2015. The second negative control was carried out in the laboratory building where the inbred lines of *D. melanogaster* are maintained, in Vitória de Santo Antão (UFPE), at 164 m a.s.l. ($08^{\circ}06'26''\text{S}$, $35^{\circ}17'54.17''\text{W}$) between 15 and 21 April 2017. The laboratory was chosen because it is a well-controlled environment in spite of presence of chemical substances, where all experiments were performed.

2.2 Exposure of organisms in environments

Adult *D. melanogaster* individuals were exposed to environments in three population boxes (triplicates) made of polyethylene terephthalate according to Verçosa et al. (2015) (Fig. 2).



Fig. 2. Population box built to expose drosophilids in the environments investigated. The box was made of a transparent polyethylene terephthalate, fine screen, a protection cover, and containing cultivation medium. Detailed description of how to build the box is shown in Verçosa et al. (2015).

Approximately 120 individuals were placed in each population box containing culture medium for the maintenance of adult individuals and offspring larvae. All boxes were hung under the shade for six days in each study site. Adult flies and larvae were fed every two days with liquid baker's yeast, and the culture medium was hydrated with distilled water. After six days of exposure, the organisms of each box were retrieved and transported to the laboratory.

2.3 Comet assay

The investigation was carried out using the Comet assay with hemolymph cells of *D. melanogaster* larvae of the Oregon-R strain according to Verçosa et al. (2017). This method helps to measure the single/ double-strand DNA breaks, alkali labile sites (apurinic/ apyrimidinic sites), DNA cross-links, base/ base-pair damages and apoptotic nuclei in the cells. The *D. melanogaster* larvae grew in the study environments and were exposed to the atmospheric conditions since the embryo stage. Hemolymph of 60 larvae from each population box were extracted together, totaling a pool of hemocytes (or one replicate). In total, three replicates from each study site were analyzed. To obtain the hemolymph cells, 60 larvae were retrieved and transferred to a Petri dish and cooled to 4° C for 1 min to reduce metabolic rate and make handling easier. Under a stereoscopic microscope and in an excavated plate containing 150 µL EDTA, they were sliced laterally using a scalper and watchmaker's

tweezers no. 5 to expose hemolymph. After that, the hemolymph pool was removed using a micropipette and transferred to a 1.5 mL microtube. The contents of tubes were centrifuged twice at 3,000 rpm for 3 min. At the end of each centrifugation, 100 μ L of the supernatant was disposed of and the volume was completed with 100 μ L EDTA.

The Comet assay was carried out using stock solutions like low-melting point agarose gel, standard agarose gel, Sodium Hydroxide solution (NaOH), and Phosphate-Buffered Saline (PBS). Other solutions were prepared immediately before use, like the lysis solution (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, NaOH 1 M, Tris 1% pH 10, Triton X-100 1%, and DMSO 10%), and the electrophoresis buffer (NaOH 1 M, EDTA 200 mM pH > 13). The upper side of histological slides was sanded to facilitate adhesion of standard agarose (1.5% diluted in PBS) to the slide. After the collection of 60 μ L of the pool hemolymph suspension, the material was homogenized in 100 μ L of low-melting point agarose (0.5%) heated at 37°C in the dark. The homogenate was transferred to a glass slide previously soaked in standard agarose and a coverslip (24 mm x 60 mm) was placed on the material. After cooled at 4°C to solidify the agarose, the coverslips were removed and the glass slides with the biological material were immersed in lyse solution at 4°C for 72 h. At the end of the cell lysis period, the material was stabilized in electrophoresis buffer at 4°C for 20 min, and the electrophoresis conducted for 20 min at 40 V and 300 mA. Slides were then exposed to a neutralization solution (Tris-HCl 0.4 M, pH 7.5) for 15 min, fixed in absolute ethanol for 5 min, left to dry, and stored at 4°C upon microscopy analysis.

Slides were stained with 50 μ L GelRed™ diluted in distilled water (1:500) and observed using a fluorescence microscope (Zeiss-Imager M2) equipped with an Alexa-Fluor 546 filter at 400x magnification. According to Collins (2013) the assay reflects the relaxation of supercoiled DNA embedded in agarose, and the migration of DNA from individual cells (nucleoids) exposed to genotoxic agents, which generate an image that resembles a comet formed by fragments of DNA. In total, 100 cells (or comets) were inspected (50 in each of two slides) for each replicate, totalizing 300 cells analyzed per each local. Comets were counted based on two parameters, the damage index (DI), and the damage frequency (DF). Briefly, DI classifies comets in five categories from 0 to 4, according to comet tail length and intensity (Fig. 3). Class 0 includes comets considered intact, that is, with no damage caused by exposure; class 1 indicates minimum damage, class 2 represents intermediate damage, class 3 indicates comets with intense damage, and class 4 includes comets with maximum damage. The values obtained through DI for each individual may vary from 0 (totally intact, 100 cells x 0) to 400 (maximum damage, 100 cells x 4) and can be calculated by the following Equation 1, in which, n is equal to the number of comets.

$$DI = 0 (\text{number of comets class 0}) + 1 (\text{N}^\circ \text{ of comets class 1}) + 2 (\text{N}^\circ \text{ of comets class 2}) + 3 (\text{N}^\circ \text{ of comets class 3}) + 4 (\text{N}^\circ \text{ of comets class 4})$$

The second parameter, DF%, was calculated as percent value of all damaged comets (class 1 to class 4) considering the total number of comets, which includes class 0 to class 4 (total number) using the Equation 2:

$$DF\% = \frac{[(n^\circ \text{ total comets} - n^\circ \text{ class 0})100]}{n^\circ \text{ total comets}}$$

The data were analyzed using the Analysis of Variance (ANOVA) and the Bonferroni *post-hoc* test in STATA software version 1.2, after the assessment of ANOVA requirements related to residual normality and variance homoscedasticity. Statistically significant differences were set at $P < 0.05$.

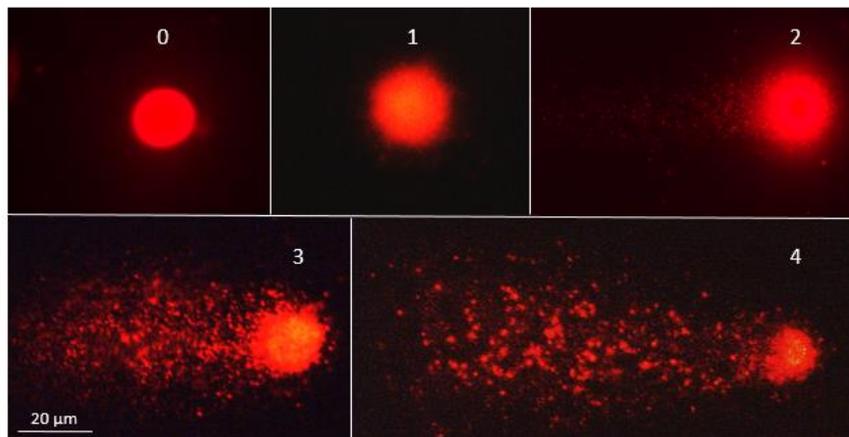


Fig. 3. The five levels of genetic damage (0 to 4) based on length and amount of DNA in comet tails. The images were using hemocytes collected from *D. melanogaster* larvae stained with GelRed™ under fluorescent microscopy. Figure from Verçosa et al. (2017) with permission.

2.4 Sampling and analysis of particulate matter (PM)

Particulate sampler from Energetics was applied to collect PM samples in both sampling points, in 2017 experiment (21 April 2017). Before operation, the equipment was set and calibrated to avoid sampling errors. PM was trapped in a cellulose filter from Altman during 180 minutes. The filter was weighted before and after sampling for determining the load of particulates. Qualitative analysis of filters were performed in the equipment EDX720 from Shimadzu. Collimator of 10 mm was applied to analyze qualitatively the PM filters in triplicate under atmosphere pressure lower than 30 Pa in chamber during 200 seconds each analysis. Voltage and electric current were automatically set by the equipment for each analytical condition. Depending on the analyte (a substance whose chemical constituents are being

identified and measured), filters were applied to minimize spectral interference during the analysis. Spectral data was compiled and compared for assessing the chemical similarity between urban and rural areas.

3. Results

Table 1 shows the mean genetic damage (levels 0 to 4), DI and DF% in *D. melanogaster* Oregon-R individuals exposed to environmental conditions in rural and urban areas in Vitória de Santo Antão, and negative control groups. The data show the high incidence of zero damage (no DNA change) in individuals exposed to the rural area (in 2015 and 2017) and in the negative controls. In turn, high classes 3 and 4 (intermediate, to high and maximum damage, respectively) were observed in individuals exposed to the urban area in the two exposure periods (2015 and 2017). Also, the negative control groups (environmental and laboratory) revealed the absence of maximum damage (class 4), and similar mean values of DI and DF% compared to rural area. In addition, the DI and DF% values of control groups and rural area were much lower to the urban area. The bar charts presented in Fig. 4 and Fig. 5 illustrate these comparisons of DI and DF% between different sites surveyed in 2015 and 2017.

Table 1. Evaluation of genetic damage in larvae of *Drosophila melanogaster* Oregon-R exposed to negative environmental control (Catimbau National Park), negative control (laboratory), and rural and urban areas in Vitória de Santo Antão.

Locations	Damage level					DI	DF%
	0	1	2	3	4		
Mean negative environmental control	78.00	9.67	10.33	2.00	0	36.33	22.00
SD	4.00	3.06	3.79	1.00	0	6.00	4.00
Mean negative control	84.67	11.00	4.33	0	0	19.67	15.33
SD	3.06	2.00	1.15	0	0	4.16	3.06
Mean rural area (2015)	86.67	8.67	4.00	0.67	0	18.67	13.33
SD	1.53	3.06	4.36	1.15	0	5.03	1.53
Mean rural area (2017)	84.33	8.67	5.67	1.00	0	23.00	15.67
SD	1.53	1.53	3.06	0	0	4.58	1.53
Mean urban area (2015)	63.00	14.33	8.67	9.67	4.67	79.33	37.00
SD	4.36	2.31	0.58	1.53	3.79	14.29	4.36
Mean urban area (2017)	58.00	5.67	10.33	9.00	17.00	121.33	42.00
SD	3.46	2.08	5.86	3.00	4.00	17.39	3.46

Damage level: zero (0) represents absence of genetic damage and 1 to 4 are the increasing levels of genetic damage. DI (Damage Index). DF% Damage Frequency. SD standard deviation.

The overall ANOVA results were statistically significant ($P < 0.001$) for DI and DF% mean values. Table 2 shows the results of Bonferroni *post-hoc* test for DI (above the diagonal) and DF% (below the diagonal) between the sites surveyed. The result of Fig. 4 and Table 2 show a marked increase of DI in urban area in the year 2017 compared to 2015, indicating a likely increase in atmospheric pollution in the urban area of Vitória de Santo Antão.

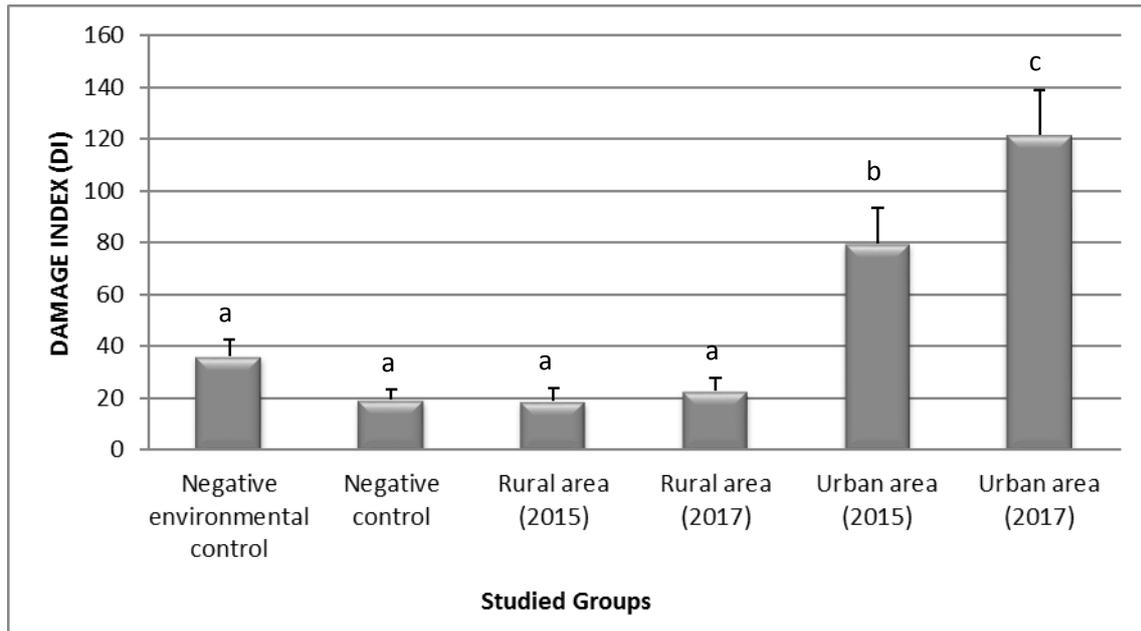


Fig. 4. Mean Damage Index (DI) in hemocytes of *D. melanogaster* Oregon-R larvae ($n = 3$ for each one). Vertical bars indicate standard deviation. Letters **a**, **b** and **c** on the top of columns indicated statistically significant differences in that studied groups which have different letters, in the Bonferroni *post-hoc* analysis ($P < 0.05$).

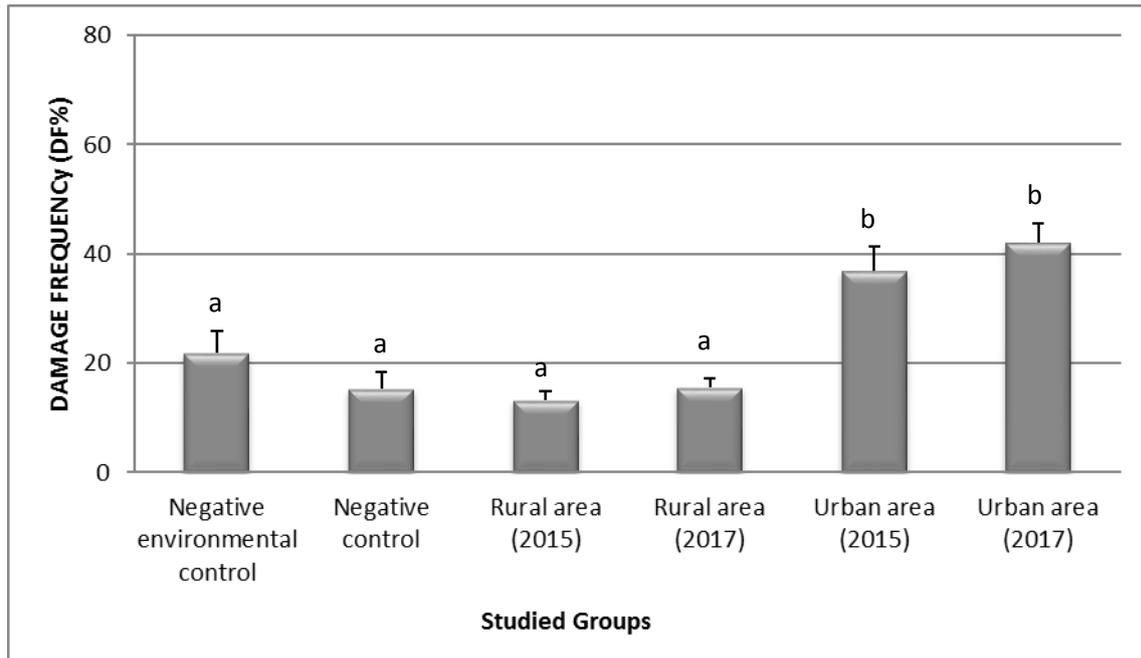


Fig. 5. Mean Damage Frequency (DF%) in hemocytes of *D. melanogaster* Oregon-R larvae ($n = 3$ for each one). Vertical bars indicate standard deviation. Letters **a** and **b** on the top of columns indicated statistically significant differences in that studied groups which have different letters, in the Bonferroni *post-hoc* analysis ($P < 0.05$).

Table 2. Bonferroni *post-hoc* analysis of Damage Index (below the diagonal) and Damage Frequency (above the diagonal) among *Drosophila melanogaster* groups.

Groups	Negative environmental control	Negative control	Rural area (2015)	Rural area (2017)	Urban area (2015)	Urban area (2017)
Negative environmental control		0.3750	0.0900	0.4740	0.0010*	0.0001*
Negative control	0.9600		1.0000	1.0000	0.0001*	0.0001*
Rural area (2015)	0.7720	1.0000		1.0000	0.0001*	0.0001*
Rural area (2017)	1.0000	1.0000	1.0000		0.0001*	0.0001*
Urban area (2015)	0.0030*	0.0001*	0.0001*	0.0001*		1.0000
Urban area (2017)	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0040*	

* Significant difference ($P < 0.05$).

Since there was no other way of damaging the DNA of the bioindicators tested, PM characteristics were investigated taking into account the presence of some chemical elements

associated to road dust fraction. Figure 6 shows the differences considering the qualitative analyses of PM filters between the studied areas. Even considering the short time of monitoring, the downtown of Vitória de Santo Antão Municipality showed higher photopeaks of chemical elements such as aluminum (Al), silicon (Si), sulfur (S), potassium (K), calcium (Ca), titanium (Ti) and iron (Fe) when compared to the rural area. Manganese, phosphorus and magnesium were detected only in PM from the urban area. Taking into account these results, the atmosphere contamination from urban pollution and suspended soil particles associated to the traffic could contribute to the differences found for biomarkers using *D. melanogaster*.

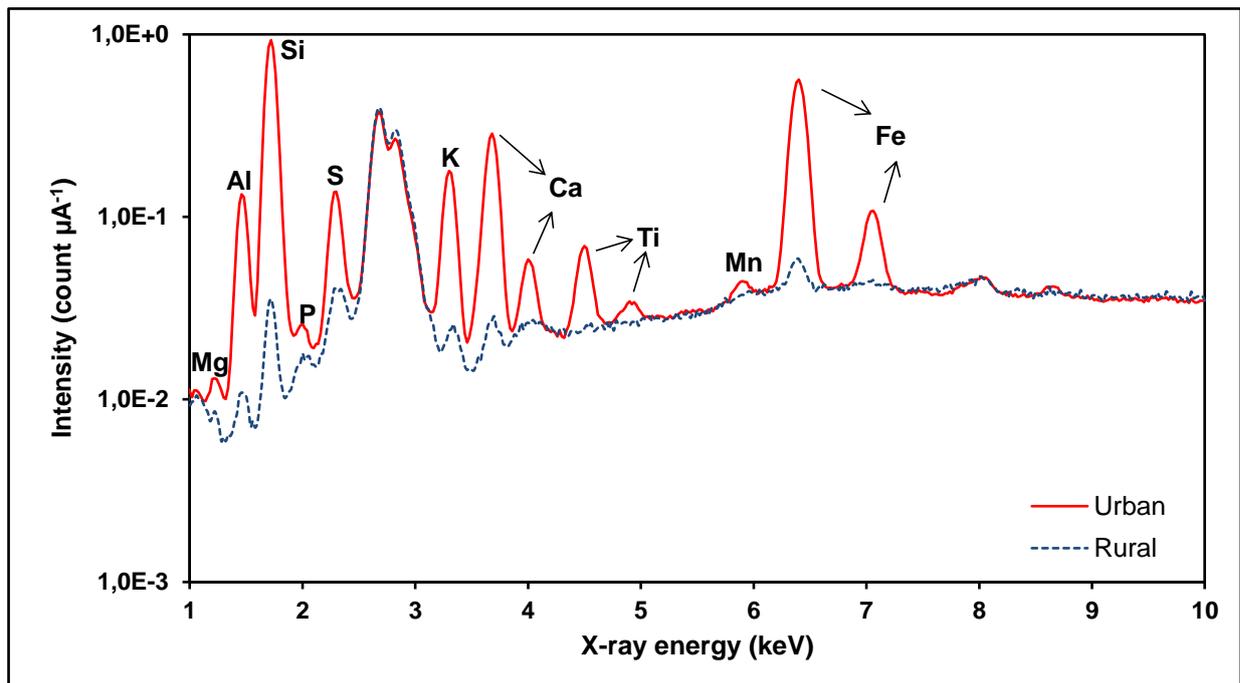


Fig. 6. Qualitative analysis of Particulate Material (MP) filters during the exposure period in the city center of Vitória de Santo Antão (urban area) and in the rural area.

4. Discussion

The data obtained in the present study reveals significant differences observed between the conserved rural environment and the polluted urban environment. Both DI and DF% indicated levels of genotoxicity in individuals exposed in downtown of Vitória de Santo Antão in the two studied periods (2015 and 2017), compared with the other rural site. The data also show that damage induced by exposure increased significantly in 2017, only in the urban environment. According to DETRAN-PE (2018), Vitória de Santo Antão presented a drastic increase in vehicles, with growth of 136% in the last 10 years (2007-2017). This represent an increase in particulate material in the urban area, as confirmed by EDXRF analysis, with

presence of carbon monoxide, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), organometallic and other contaminants in the atmosphere of the town (Bocchi et al., 2016).

In this study, Comet assay has detected genetic damage probably caused by atmospheric pollution in an urban area. In fact, *D. melanogaster* is sensitive to chemical elements mainly in high concentrations, in which free radicals and arsenic substances could affect hatching and larvae development (Meyer et al., 2014; Neethu & Shibu Vardhanan, 2016). The PM filter from urban area was enriched in iron, silicon, aluminum and manganese, chemical elements mainly associated to road dust, one of the main sources of particulate matter with impacts on air quality, health and climate (López et al., 2011; Alves et al., 2018). The Comet assay methodology was also a tool to evaluate the urban pollutants genotoxicity using two species of plants (*Taraxacum officinale* and *Robinsonecio gerberifolius*) by Gómez-Arroyo et al. (2018). After atmospheric exposed in Mexico City, the authors obtained greater damage in leaves exposed in the urban environment compared to the rural and the controls. In another study about the risk of pollutants, Douki et al. (2018) repeatedly exposed rats to the exhaust of diesel engines, observing toxic and genotoxic effects in the animals exposed. Pereira et al. (2014) performed the biomonitoring of air quality in the city of Uberlândia, Brazil, using the micronucleus test methodology in the plant *Tradescantia pallida*. They found a higher frequency of micronuclei in the organisms exposed to urban region of the city compared to the control site. Rainho et al. (2016) also used the micronucleus test in oral mucosa and peripheral blood cells of workers in tunnels exposed to heavy air pollution in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Once again, a higher frequency of micronuclei was observed in exposed workers, in relation to the control group.

Through the biomonitoring test using comet assay in the model organism *D. melanogaster*, we were able to suggest that air pollutants present in urban environment of Vitória de Santo Antão are responsible for DNA damages in organisms exposed. These genotoxic effects observed reinforce the findings of other studies carried out in urban environments of Brazil, which warn about the environmental risks related to air pollution, a threat for health of residents and local workers (Carneseca et al., 2012; Nardocci et al., 2013; Nascimento and Francisco, 2013). The results also reinforce the use of *D. melanogaster* as an ideal organism in *in vivo* studies of air pollution monitoring and volatile organic compounds (Wasserkort and Koller, 1997; Wilson et al., 2005; Inamdar et al., 2010; Rand, 2010; Morozova et al., 2014; AL-Malik et al., 2017; Eom et al., 2017; Verçosa et al., 2017).

5. Conclusion

The findings of this study can provide the basic understanding of the spatial and annual variations of atmospheric pollution in a city of Brazil. Total damage index and frequency index

of genotoxicity analyzed in larvae of *D. melanogaster* were higher in outdoor urban environment of Vitória de Santo Antão, Brazil, compared to the rural site. For a more comprehensive assessment on exposure risk, the presence of some chemical elements associated to road dust fraction were investigated. PM filters were quite different between the urban and rural area, indicating the higher atmospheric pollution in Vitória de Santa Antão urban area. The *D. melanogaster* was an excellent model organism for analyzing genotoxicity by means of the Comet assay and helpful in future studies for atmospheric monitoring of polluted sites and for better understanding of human health risk assessment.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) from Brazil. Special thanks are due to our colleagues from Laboratory of Genetics for their help in the field sampling.

References

- AL-Maliki H.S., Martinez S., Piszczatowski P., Bennett J.W., 2017. *Drosophila melanogaster* as a model for studying *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* 45, 233-239.
- Alves C.A., Evtugina M., Vicente A.M.P., Vicente E.D., Nunes T.V., Silva P.M.A., Duarte, M.A.C, Pio C.A., Amato F., Querol X., 2018. Chemical profiling of PM₁₀ from urban road dust. *Science of the Total Environment* 634, 41-51.
- Bajpayee M., Dhawan A., 2014. Biomarkers for monitoring adverse health effects of air pollution in humans. *Journal of Translational Toxicology* 1, 46-51.
- Bocchi C., Bazzini, C., Fontana, F., Pinto, G., Martino, A., Cassoni, F., 2016. Characterization of urban aerosol: seasonal variation of mutagenicity and genotoxicity of PM_{2.5}, PM₁ and semi-volatile organic compounds, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 809, 16-23.
- Carneseca E.C.; Achcar J.A.; Martinez, E.Z., 2012. Association between particulate matter air pollution and monthly inhalation and nebulization procedures in Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 28,1591-1598.
- DETRAN-PE, 2018. (Departamento Estadual de Trânsito de Pernambuco). Estatística da frota de veículos segundo os municípios - Pernambuco. http://www.detran.pe.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=36&Itemid=72. Accessed on 30 January 2018.

- Douki, T., et al., 2018. Comparative study of diesel and biodiesel exhausts on lung oxidative stress and genotoxicity in rats. *Environmental Pollution*, 235, 514-524.
- Eom H.J., Liu Y., Kwak G.S., Heo M., Song K.S., Chung Y.D., Chon T.S., Choi J., 2017. Inhalation toxicity of indoor air pollutants in *Drosophila melanogaster* using integrated transcriptomics and computational behavior analyses. *Scientific Reports* 7, 46473.
- Feretti D., et al., 2014. Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy: the protocol of the prospective cohort MAPEC study. *Journal of Neuro Interventional Surgery* 4, 1-8.
- Gaivão I., Sierra, M., 2014. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. *Frontiers in Genetics* 5, Article 304.
- Gómez-Arroyo, et al.; 2018. *In situ* biomonitoring of air quality in rural and urban environments of Mexico Valley through genotoxicity evaluated in wild plants. *Atmospheric Pollution Research*, v. 9, p. 119-125.
- IARC, 1983. International Agency for Research on Cancer. Polynuclear Aromatic Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, v. 32, December, 1983, Lyon, France.
- IBGE, 2016. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Demográfico, 2016.
- Imanikia S., et al., 2016. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology Pharmacology* 45, 356-361.
- Inamdar A.A., Masurekar, P., Bennett, J.W., 2010. Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Toxicological Sciences*, 117, 418-426.
- Lemos A.T., et al., 2012. Mutagenicity of particulate matter fractions in areas under the impact of urban and industrial activities. *Chemosphere* 89, 1126-1134.
- Lenz S. et al., 2013. *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry* 127, 453-460.
- López M. L., Ceppi S., Palancar G. G., Olcese L. E., Tirao G., Toselli B. M. Elemental concentration and source identification of PM10 and PM2.5 by SR-XRF in Córdoba City, Argentina. *Atmospheric Environment* 45, 5450-5457.
- Meyer S., Schulz J., Jeibmann A., Taleshi M. S., Ebert, F., Francesconi K. A., Schwerdtle T., 2014. Arsenic-containing hydrocarbons are toxic in the *in vivo* model *Drosophila melanogaster*. *Metallomics* 6, 2010-2014.
- Møller P., et al., 2015. Applications of the comet assay in particle toxicology: air pollution and engineered nanomaterials exposure. *Mutagenesis* 30, 67-83.

- Moraes-Filho A.V., Carvalho C.J.S., Verçosa C.J., Gonçalves M.W., Rohde C., Silva D.M., Cunha K.S., Chen-Chen L., 2017. *In vivo* genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in their clinical combinations in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research Genotoxicity Toxicity Environment 820, 31-38.
- Morozova, T.V., Mackay, T.F., Anholt, R.R. 2014. Genetics and genomics of alcohol sensitivity. Molecular Genetics and Genomics 289, 253-269.
- Nandhakumar S., Parasuraman S., Shanmugam M.M., Ramachandra R.K., Parkash Chand, Vishnu B.B. 2011. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics 2, 107-111.
- Nardocci A.C., Freitas C.U., Leon A.C.M.P., Junger W.L., Gouveia N.C. 2013. Air pollution and respiratory and cardiovascular diseases: a time series study in Cubatão, São Paulo State, Brazil. Cadernos de Saúde Pública 29, 1867-1876.
- Nascimento L.F.C.; Francisco J.B. 2013. Particulate matter and hospital admission due to arterial hypertension in a medium-sized Brazilian city. Cadernos de Saúde Pública 29, 1565-1571.
- Neethu C.B., Shibu Vardhanan Y. 2016. Effect of minerals on free radicals induced damages in *Drosophila melanogaster*. International Journal of Toxicological and Pharmacological Research 8, 346-352.
- Nehr, S., Franzen-Reuter, I., Kucejko, C., 2017. New directions: Future approaches to the standardized assessment of airborne pollutants affecting environmental quality. Atmospheric Environment 166, 570-572.
- Noronha, E.A.P. 2013. Análise das potencialidades e vulnerabilidades socioambientais decorrentes do processo da industrialização no município de Vitória de Santo Antão - PE. Dissertation, Universidade de Pernambuco, Recife.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: A review. Mutation Research 567, 109–149.
- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 123, 291-298.
- Peraza-Veja, RI, et al., 2016. Assessing genotoxicity of diuron on *Drosophila melanogaster* by the wing-spot test and the wing imaginal disk comet assay. Toxicology and Industrial Health 33, 443-453.
- Pereira, B.B., et al., 2014. Biomonitoring air quality during and after a public transportation strike in the center of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil by Tradescantia micronucleus bioassay. Environmental Science and Pollution Research International, v. 21, p. 3680-3685.

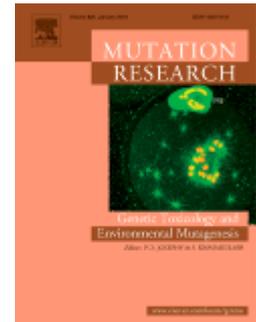
- Rainho, C.R., et al.; 2016. Biomonitoring of tunnel workers exposed to heavy air pollution in Rio de Janeiro, Brazil. *Air Quality, Atmosphere and Health* 01, 01-06.
- Rand M. D., 2010. Drosophotoxicology: the growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 74-83.
- Redlarski, G., et al., 2015. The influence of electromagnetic pollution on living organisms: historical trends and forecasting changes. *BioMed Research International* 2015, 1-18..
- Verçosa C.J., Castro I.F.A., Garcia A.C.L., Rohde C., 2015. An efficient rearing population cage to expose Drosophilids to various environmental agents. *Drosophila Information Service* 98, 144-145.
- Verçosa, C.J., et al., 2017. Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 141, 148-153.
- Wasserkort R., Koller T. 1997. Screening toxic effects of volatile organic compounds using *Drosophila melanogaster*. *Journal of Applied Toxicology* 17, 119-125.
- Wilson M. et al., 2005. Are *Drosophila* a useful model for understanding the toxicity of inhaled oxidative pollutants: a review. *Inhalation Toxicology* 17, 765-774.

5. ARTIGO 2

Em preparação, a ser submetido para

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

B2 Biodiversidade, Fator de Impacto: 2,133



Avaliação do risco genotóxico ambiental associado à três usinas termelétricas na Área de Proteção Ambiental Aldeia-Beberibe (Nordeste do Brasil)

Evaluation of genotoxic environmental risk associated with three thermoelectric power plant in the Aldeia-Beberibe Environmental Protection Area (northeastern Brazil)

Samuel Lima de Santana^{a,b}, Érima Maria de Amorim^b, Ícaro Fillipe de Araújo Castro^b, Cícero Jorge Verçosa^b, Edson Francisco do Carmo Neto^b, Rayane Santana da Silva^b, Renata Barros de Oliveira^b, Herbert de Tejo Pereira^c, Claudia Rohde^b

^a Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil;

^b Laboratório de Genética, CAV-UFPE, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

^c Fórum Socioambiental de Aldeia, Camaragibe, Pernambuco, Brasil.

Autor para correspondência: Claudia Rohde. Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bairro Bela Vista, CEP 51608-680, Vitoria de Santo Antão, Pernambuco, Brasil, e-mail claudia.rohde@yahoo.com.br Telefone: +55 81 3114.4100.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial efeito genotóxico da poluição atmosférica emitida por três Usinas Termelétricas (Termomanaus, Pau Ferro I e Pernambuco III), que juntas formam um aglomerado de usinas no município de Igarassu (estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil). Para este estudo, células somáticas de larvas do organismo-modelo

Drosophila melanogaster (Diptera, Drosophilidae) foram expostas por seis dias em cinco locais próximos do conglomerado das três usinas termelétricas, situadas dentro dos limites da Área de Proteção Ambiental (APA Aldeia-Beberibe), local ideal para o estudo do efeito direto dos poluentes atmosféricos liberados. Houve registro de efeito genotóxico nos organismos expostos no local mais próximo das termelétricas (0,7 km) em outubro de 2016, quando ocorreu relativa produção de energia pelas termelétricas, medida em quilowatts (kW). A avaliação dos danos genéticos foi feita por meio do ensaio cometa, em células somáticas da hemolinfa. No mesmo período do ano seguinte (outubro de 2017), não houve efeito genotóxico decorrente dos poluentes atmosféricos, reflexo da baixa produção de energia elétrica no local. Os resultados conjuntos demonstram que houve uma significativa redução do efeito genotóxico nos organismos, em 2017, reflexo positivo do desligamento parcial das usinas. Embora preliminar, este estudo local é um alerta para a necessidade de biomonitorar a poluição atmosférica no entorno de usinas termelétricas, a fim de evitar consequências negativas para a saúde humana e para o meio ambiente no local.

Palavras-chave: Ensaio cometa, genotoxicidade, *Drosophila melanogaster*, poluição.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the possible genotoxic effect of the air pollution emitted by three Thermoelectric power plants (Termomanaus, Pau Ferro I and Pernambuco III), which together form an agglomerate of power plants in the municipality of Igarassu (state of Pernambuco, northeastern Brazil). The comet assay is a biomarker of genetic damage that relies on the migration of DNA fragments soon after exposure of somatic cells to genotoxic agents. For this study, somatic cells of the larvae of the *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) were exposed for six days in five sites near the conglomerate of three thermoelectric power plants located within the limits of the Environmental Protection Area (APA Aldeia-Beberibe), an ideal place to study the direct effect of atmospheric pollutants released. There was a genotoxic effect on exposed organisms at the nearest place of thermoelectric plants (0.7 km) in October 2016, when there was relative energy production, measured in kilowatts (kW). The evaluation of genetic damage was done by means of the comet assay, in hemolymph somatic cells. In the same period of the following year (October 2017), there was no genotoxic effect due to the atmospheric pollutants, reflecting the low production of electric energy at the site. The combined results demonstrate that there was a significant reduction of the genotoxic effect in organisms in 2017, a positive reflection of the partial shutdown of the plants. Although preliminary, this local study is a warning for the need to biomonitor air pollution in the reversal

of thermoelectric plants, in order to avoid negative consequences for human health and for the environment in the place.

Key-words: Comet assay, genotoxicity, *Drosophila melanogaster*, pollution.

1. Introdução

As usinas hidrelétricas são as principais fontes geradoras de eletricidade no Brasil. No entanto, devido ao esgotamento dos reservatórios de água e falta de chuva em várias regiões, especialmente no Nordeste, as usinas termelétricas (UTES) têm sido utilizadas nos últimos anos como fonte alternativa para suprir as necessidades de consumo de energia elétrica. Segundo o Instituto de Energia e Meio Ambiente do Brasil [1] centrais termelétricas produzem energia elétrica a partir da energia liberada por reações químicas, a partir da queima de combustível fóssil, sejam eles líquidos, sólidos ou gasosos. A energia térmica liberada é convertida em trabalho em máquinas térmicas que, por estarem conectadas ao gerador elétrico, geram eletricidade.

Dentre os poluentes liberados por usinas termelétricas estão os óxidos de nitrogênio - como o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o óxido nitroso (N_2O) - que são formados pela associação do nitrogênio com o oxigênio. Estes têm efeitos negativos sobre a vegetação e a saúde humana, principalmente quando combinado com outros gases, como o dióxido de enxofre, causadores do efeito estufa e redução da camada de ozônio [2]. Outros poluentes gerados são o monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HCs) e dióxido de carbono (CO_2). Esses gases contribuem na formação de oxidantes fotoquímicos, na formação de chuva ácida e, conseqüentemente, na intensificação das mudanças climáticas globais [3].

Entre as aproximadamente 3.000 usinas termelétricas em funcionamento no Brasil [4], três delas se destacam por estarem instaladas na Área de Proteção Ambiental (APA) Aldeia-Beberibe, no estado de Pernambuco, nordeste do país: UTE Pau Ferro I, Termomanaus e Pernambuco III. A APA Aldeia-Beberibe (criada pelo Decreto Nº 34.692 em 17 de março de 2010) é importante por proteger os mananciais de água potável que abastecem os municípios da Região Metropolitana do Recife. Normalmente, usinas termelétricas são instaladas próximas a fontes de água que é utilizada para o resfriamento, o que pode acarretar um prejuízo da fauna e da flora da região, além de aumentar a temperatura local, contribuindo também para o aumento da poluição, com a promoção da liberação de seus gases, acarretando risco a saúde humana e ao meio ambiente. Isso desencadeia falta de oxigênio nas células do corpo causado pelo monóxido de carbono [5], formação da chuva ácida e liberação do dióxido de nitrogênio, causando danos à vegetação, colheita, saúde humana etc [6]. Diante disso, este trabalho se propôs a avaliar o risco genotóxico associado ao

funcionamento das usinas termelétricas movidas a combustíveis fósseis (óleo diesel e gás), em cinco locais do entorno das termelétricas e em dois anos consecutivos, tendo como modelo biológico *Drosophila melanogaster*.

2. Material e Métodos

2.1 Local de estudo

Para avaliar o possível efeito genotóxico dos poluentes atmosféricos foi escolhida a área do entorno do complexo de três usinas termelétricas (UTES Pau Ferro, Termomanaus e Pernambuco III), uma área privada que pertence a Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (CHESF), situada no município de Igarassu, estado de Pernambuco, Brasil. Caixas de populações contendo indivíduos adultos de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R foram expostas aos ambientes, distantes do conjunto de usinas a 0,7 km (ponto 1) (07°51'21.5"S, 35°01'21.7"W); 1,0 km (ponto 2) (07°52'11.8"S, 35°00'56"W); 1,5 km (ponto 3) (07°50'48.6"S, 35°00'40"W); 5,0 km (ponto 4) (07°53'28.7"S, 35°02'50.3"W); e 6,0 km (ponto 5) (07°54'55.8"S, 35°00'57.8"W), conforme indicado na Fig. 1. O experimento foi realizado nestes cinco locais em outubro de 2016, e repetido em outubro de 2017 apenas nos pontos 1, 2 e 3, os mais próximos das usinas.

2.2. Exposição dos organismos aos ambientes

Indivíduos adultos de *D. melanogaster* permaneceram por seis dias expostos em cada local do estudo (pontos 1 a 5) dentro de caixas de população, construídas com garrafas PET segundo especificações de Verçosa et al. [7]. As caixas (3 réplicas) ficaram suspensas em local sombreado, no mês de outubro de 2016 e outubro de 2017. Adultos e larvas descendentes ficam permanentemente em contato com o ar e os agentes atmosféricos presentes no ambiente, uma vez que nas laterais das caixas havia uma tela fina, de cerca de 15 cm, para a entrada de ar. Cerca de 120 indivíduos foram colocados em cada caixa, que continha no seu interior meio de cultivo padrão, para manutenção dos indivíduos adultos e larvas. Os adultos foram alimentados a cada dois dias com fermento líquido e o meio foi hidratado com água destilada misturada ao fermento. Após seis dias, as caixas foram retiradas e os organismos foram levados ao Laboratório de Genética. Os adultos foram congelados para futuras análises e as larvas foram submetidas à metodologia do ensaio cometa. Um grupo controle negativo foi exposto no laboratório, também durante seis dias consecutivos.

Figura 1. A. Imagem aérea do conjunto de três usinas Termelétricas e indicação do ponto 1 de exposição dos drosofilídeos, afastado 0,7 km. B. Indicação dos cinco pontos de exposição dos

drosofilídeos (pontos 1 a 5) na Área de Proteção Ambiental Aldeia-Beberibe (verde escuro). O círculo amarelo indica o conjunto de usinas termelétricas. Fonte: Google Earth.



2.3 Ensaio Cometa

Para o estudo foi analisado o material genético de células da hemolinfa (hemócitos) das larvas de *D. melanogaster*, que se desenvolveram (de ovo ao terceiro estágio) nos cinco locais de estudo. A metodologia do ensaio cometa, bem como as análises estatísticas (ANOVA e *post-test* de Bonferroni), seguiram conforme a metodologia descrita em detalhes por Verçosa et al. [8].

2.4 Estimativas da poluição das termelétricas

A fim de estimar indiretamente os níveis de poluição nos meses anteriores aos estudos (novembro a setembro/2016 e novembro a setembro/2017), foram averiguadas as medidas de produção de energia térmica (em quilowatts - kW) das três termelétricas juntas, nos onze meses anteriores aos experimentos de campo. Para obter o valor mensal, foram somados os valores semanais divulgados pela ONS (Operador Nacional do Sistema Elétrico) 2018 [9].

3. Resultados

Após aplicação do ensaio cometa e análise das lâminas em microscopia de fluorescência os níveis de dano genético foram contabilizados e classificados de zero (ausência de dano) até quatro (dano máximo), de acordo com Verçosa et al. [8]. Para cada réplica e local, 100 células foram analisadas, sendo 50 em cada uma das lâminas. Estas células representam um *pool* de hemócitos de 60 diferentes larvas, da mesma réplica. A partir dos níveis de dano médios em cada grupo estudado, foram calculados o Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (DF%) (Verçosa et al. (2017) [8] e os resultados estão apresentados na Tabela 1, nos dois anos do estudo (2016 e 2017).

Tabela 1. Avaliação do dano genético em células somáticas de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas a diferentes distâncias das usinas termétricas (0,7, 1,0, 1,5, 5,0 e 6,0 km), situadas no município de Igarassu, Pernambuco, Brasil, e grupo controle negativo.

Grupos	Nível de Dano Genético					DI	DF%
	0	1	2	3	4		
Controle Negativo							
Média	84,7	11,0	4,3	0	0	19,7	15,3
SD	3,1	2,0	1,2	0	0	4,2	3,2
0,7 km (2016)							
Média	40,0	19,3	12,3	15,7	12,0	139,0	60,0
SD	9,0	4,0	1,2	5,0	4,2	21,7	9,0
0,7 km (2017)							
Média	71,7	16,7	6,7	1,7	0	35,0	28,3
SD	1,5	1,1	2,3	1,5	0	9,5	1,5
1,0 km (2016)							
Média	78,0	13,0	7,3	2,0	1,3	39,0	22,0
SD	8,7	2,0	4,0	3,5	2,3	29,4	8,7
1,0 km (2017)							
Média	77,3	16,0	6,7	0	0	39,0	22,7
SD	0,6	1,0	1,1	0	0	29,3	0,6
1,5 km (2016)							
Média	81,7	10,7	5,7	1,0	0	25,0	18,3
SD	4,0	1,5	2,5	1,7	0	9,6	4,0
1,5 km (2017)							
Média	80,0	14,3	5,7	0	0	25,7	20,0
SD	2,0	0,6	1,5	0	0	3,5	2,0
5,0 km (2016)							
Média	84,0	12,3	3,7	0	0	19,7	16,0
SD	7,2	4,2	3,1	0	0	10,3	7,2
6,0 km (2016)							
Média	78,3	11,7	5,0	0	0	21,7	21,7
SD	7,8	4,7	2,0	0	0	8,1	7,8

Níveis de dano genético: zero (0) representa ausência de dano, 1 a 4 representa níveis aumentados de dano genético. DI: Índice do Dano. DF%: Frequência de Dano. SD: Desvio Padrão.

As Figuras 2 e 3 permitem uma comparação dos resultados médios obtidos (e os respectivos desvios padrão médios) de ID e FD% para os grupos estudados, com destaque aos valores elevados obtidos no local 1 (0,7 km), o mais próximo das usinas, no ano de 2016.

Figura 2. Índice de Dano dos grupos estudados de *Drosophila melanogaster* (2016 e 2017).

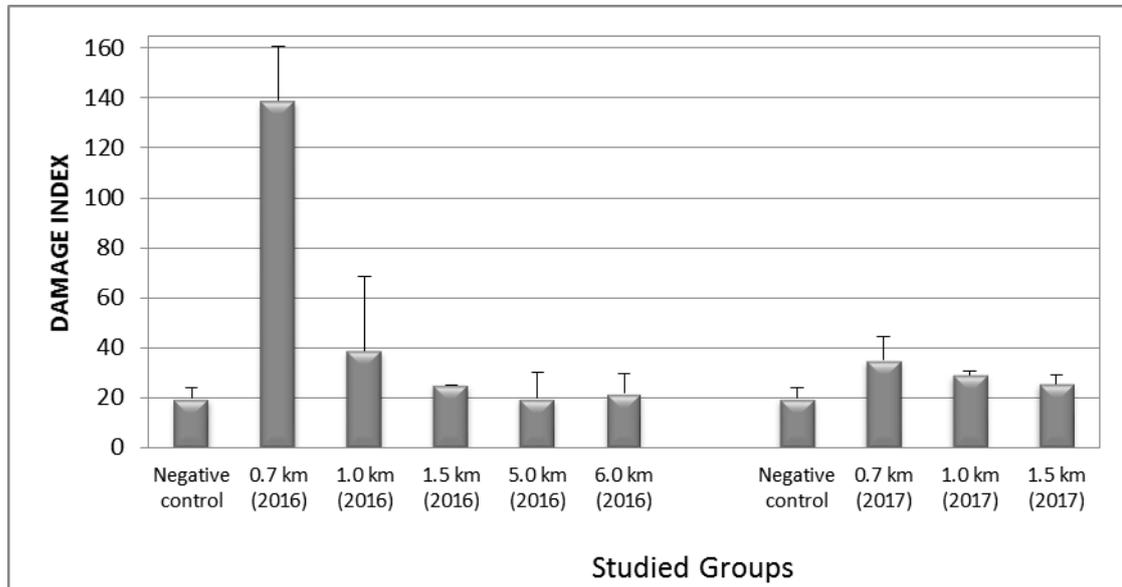
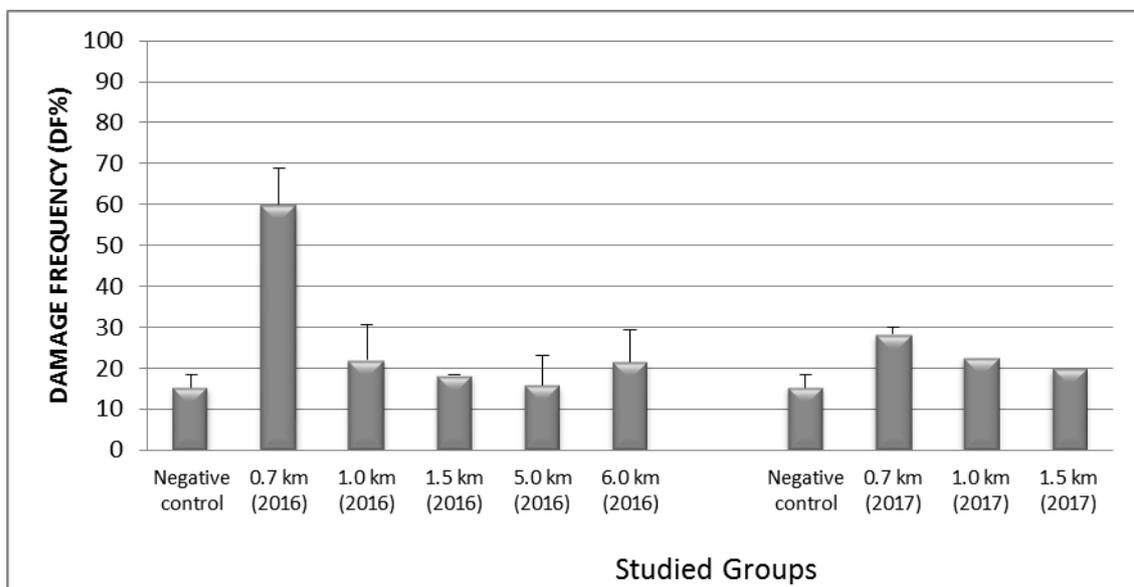


Figura 3. Frequência de Dano (DF%) dos grupos estudados de *Drosophila melanogaster* (2016 e 2017).



Na análise estatística aplicada aos dados (*post-test* de Bonferroni, Tabela 2), observa-se que de fato houve efeito genotóxico significativamente superior em indivíduos expostos no ponto 1, situado a 0,7 km das usinas termelétricas, em 2016. Por outro lado, em 2017, este

efeito não foi observado, e o ponto 1 não se diferenciou estatisticamente dos demais pontos estudados.

Tabela 2. Análise estatística (*post-test* de Bonferroni) entre os valores de Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) nos grupos tratados e controle negativo, em dois anos consecutivos de estudo (2016 e 2017).

Grupos	Controle negativo	1 0,7 km (2016)	2 1,0 km (2016)	3 1,5 km (2016)	4 5,0 km (2016)	5 6,0 km (2016)	1 0,7 km (2017)	2 1,0 km (2017)	3 1,5 km (2017)
Controle negativo		0.0001*	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
0,7 km (2016)	0.0001*		0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*
1,0 km (2016)	1.000	0.0001*		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
1,5 km (2016)	1.000	0.0001*	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
5,0 km (2016)	1.000	0.0001*	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000
6,0 km (2016)	1.000	0.0001*	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000
0,7 km (2017)	1.000	0.0001*	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000
1,0 km (2017)	1.000	0.0001*	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000
1,5 km (2017)	1.000	0.0001*	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	

* Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Para explicar os resultados obtidos, fez-se um apanhado da produção de energia térmica das três termelétricas (Pau Ferro I, Termomanaus e Pernambuco III) nos anos de 2016 e 2017 (Figuras 4 e 5, respectivamente). Uma análise das medidas de onze meses anteriores a outubro de 2016, registrou uma soma 1440,65 kW de energia produzida pelo conjunto das três termelétricas. Em contrapartida, nos meses anteriores a outubro de 2017, a soma da produção foi menor, com 905,20 kW. Em outras palavras, a média de energia produzida nos meses anteriores a outubro de 2016 foi 131,0 kW, e a média produzida nos meses anteriores a outubro de 2017 foi 82,3 kW. Estes resultados apontam para uma maior ocorrência de poluição em 2016, corroborando os resultados da maior Índice de Dano e Frequência de Dano no ponto 1, em 2016.

Figura 4. Meses do ano (novembro de 2015 a setembro de 2016) e média da produção mensal (em kW) das três termelétricas juntas (Pau Ferro I, Termomanaus e Pernambuco III). A seta azul indica o período de realização dos experimentos (pontos 1 a 5).

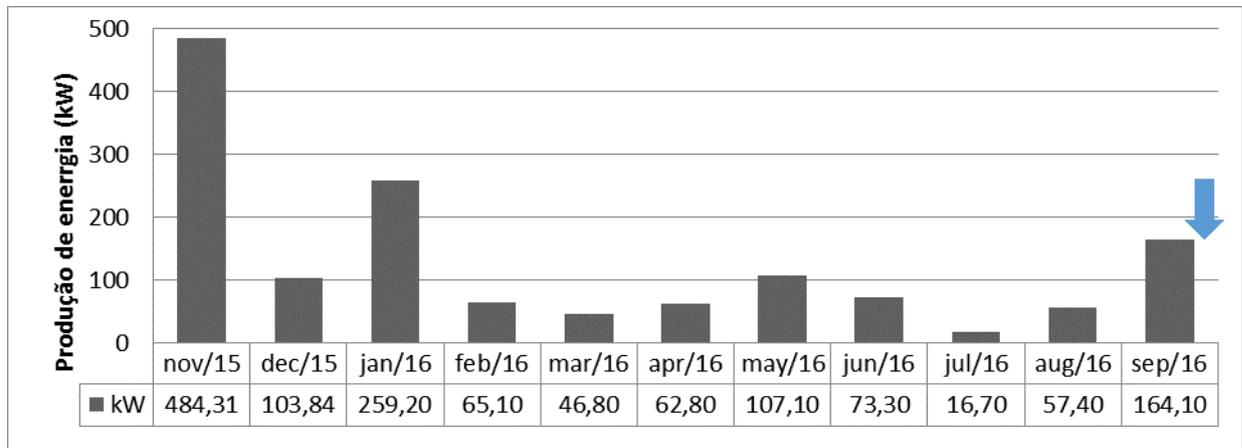
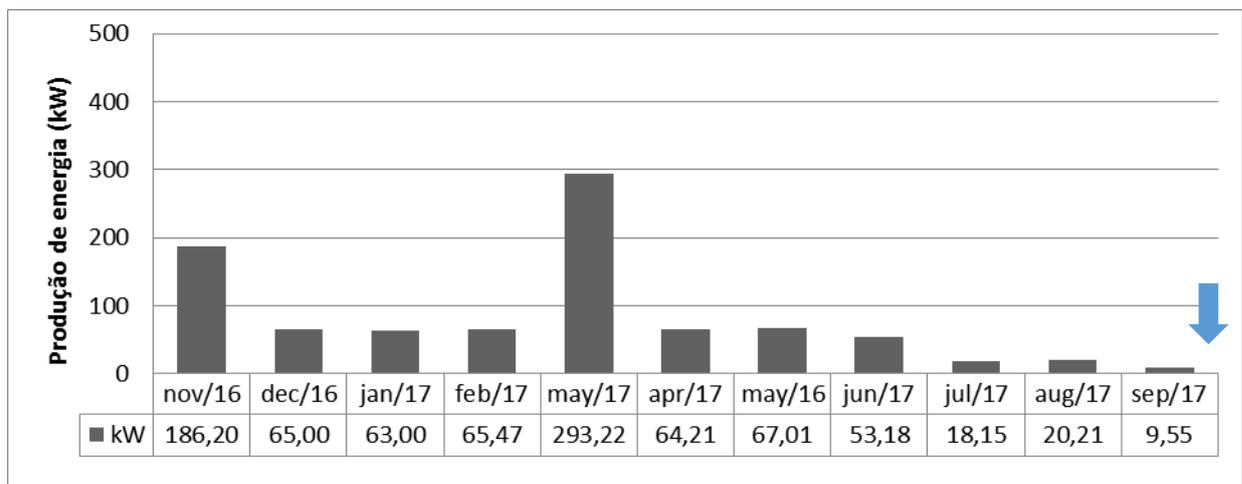


Figura 5. Meses do ano (novembro de 2016 a setembro de 2017) e média da produção mensal (em kW) das três termelétricas juntas (Pau Ferro I, Termomanaus e Pernambuco III). A seta azul indica o período de realização dos experimentos (pontos 1 a 3).



4. Discussão

Os resultados observados no Ensaio Cometa com hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* demonstraram aumento significativo de danos genéticos nos organismos submetidos ao ambiente mais próximo do conjunto de usinas (0,7 km) em 2016. No entanto, pode-se observar que em 2017, os indivíduos expostos nesse local não apresentaram danos genotóxicos significativos.

Em uma análise prévia do nosso grupo de pesquisa na mesma região (Verçosa et al., dados não publicados), haviam duas UTEs (Pau Ferro I e Termomanaus) funcionando com capacidade total. Já em nosso estudo existiam três em funcionamento, entretanto, com capacidade reduzida. A este fato pode-se atribuir a diminuição no número de danos genéticos no ponto 1 apresentados em 2017. De acordo com as evidências acumuladas até o momento, é possível sugerir que, se as três usinas estivessem em pleno funcionamento ao longo de 2016 e 2017, como ocorreu na época do estudo de Verçosa et al., seriam esperados danos significativamente maiores em mais pontos amostrados, principalmente nos mais próximos às termelétricas (pontos 1, 2 e 3).

Segundo Marcilio e Gouveia [10], é preciso conhecer bem os impactos negativos da poluição gerada por usinas termelétricas e quais as reais vantagens da implementação deste tipo de geração de energia elétrica. Neste sentido, alguns trabalhos evidenciam fortemente os riscos associados à saúde humana e ao meio ambiente por exposição aos poluentes de termelétricas [11] [12] [13]).

Os resultados aqui obtidos são a primeira evidência do efeito negativo da poluição atmosférica associada às usinas termelétricas em Igarassu, que estão situadas em uma grande área de preservação ambiental, o que contribui para a melhor investigação do efeito poluente restrito às UTEs. No Brasil e no mundo, infelizmente, há poucas investigações sobre o efeito tóxico genético associado aos poluentes emitidos por usinas termelétricas. Entre os poucos estudos genotóxicos, destacam-se o de Garcia et al. [14] realizado em uma termelétrica de Portugal. Por meio da análise de micronúcleo, os autores encontraram alteração no material genético de células epiteliais bucais de trabalhadores da usina que foram doze vezes maiores do que no grupo controle, demonstrando efeito mutagênico significativo, além de anormalidades celulares associados aos elevados níveis de substâncias gasosas.

Outra investigação de destaque foi realizada por Celik et al. [15] que relataram elevado risco genotóxico (teste de micronúcleo) em células de linfócitos periféricos de trabalhadores de uma usina termelétrica na Turquia, movida a carvão. No estudo foram também observadas aberrações cromossômicas, poliploidia, troca de cromáticas irmãs nos linfócitos dos trabalhadores.

Como pode ser visto, a metodologia do micronúcleo é bastante utilizada, porém mais recentemente, o ensaio cometa também tem ganhado destaque para a investigação dos riscos associados às termelétricas. No Brasil, um interessante estudo realizado por Menezes et al. [16] que utilizaram esta metodologia para o monitoramento dos poluentes liberados por uma usina termelétrica alimentada a carvão (Candiota, Rio Grande do Sul). O estudo avaliou

a genotoxicidade em linfócitos periféricos humanos, após a ingestão do extrato aquoso da planta nativa *Baccharis trimera*, coletada no entorno da usina (a 2,5, 6,3 e 6,5 km). Da mesma forma que o observado em nosso estudo, houve um aumento significativo da genotoxicidade associado aos extratos das plantas coletadas mais próximas da usina de Candiota, que também apresentaram níveis mais elevados de elementos inorgânicos.

Além dos riscos associados a exposição dos organismos às termelétricas, este estudo abre várias perspectivas para que mais estudos sejam realizados sobre a poluição ambiental em ambientes próximos a fontes poluentes, através da metodologia do ensaio cometa, utilizando *D. melanogaster* como organismo modelo experimental.

Financiamento

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ-UFPE).

Agradecimentos

Agradecimentos especiais são devidos aos colegas do Laboratório de Genética pela ajuda técnica, e ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo financiamento das atividades de campo.

Referências

- [1] IEMA (Instituto de Energia e Meio Ambiente) Termoeletricidade em Foco: Geração termelétrica e emissões atmosféricas: poluentes e sistemas de controle. Instituto de Energia e Meio Ambiente, São Paulo, 2016. <<http://www.energiaeambiente.org.br/wpcontent/uploads/2016/11/iema-emissoes.pdf>> Accessed on 24 January 2018.
- [2] I. M. Silva. Gás natural: a sua utilização na geração de energia elétrica no Brasil. Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense. 1 (2010) 103-107.
- [3] L.A.P. Peres, L.A.H Nogueira, G.L.Torres. Impactos das emissões atmosféricas provocadas por geradores diesel em estudos de fontes de energia no meio rural. **An. 3. Enc. Energ. Meio Rural**, (2003).

- [4] ANEEL (Agência Nacional de Energia Elétrica). Banco de informações de geração de energia elétrica. 2018 <<http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/Combustivel.cfm>> Accessed em : 15 January 2018.
- [5] **C. Baird, M.Cann. Química Ambiental. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.**
- [6] **P.A. Vesilind, S. M. Morgan. Introdução à Engenharia Ambiental. São Paulo:Cengage Learning, 2ºed, 2011.**
- [7] C.J. Verçosa, I.F.A. Castro, A.C.L. Garcia, C. Rohde. An efficient rearing population cage to expose *Drosophilids* to various environmental agents. *Drosophila Information Service*. 98 (2015) 144-145.
- [8] C.J. Verçosa, et al. Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety** . 141 (2017) 148-153.
- [9] ONS - Operador Nacional do Sistema Elétrico. Boletim Semanal da Operação – BSO (2018) <<http://sdro.ons.org.br/SDRO/semanal/>> Accessed em : 15 January 2018.
- [10] I. Marcilio, N. Gouveia. Quantifying the impact of air pollution on the urban population of Brazil. *Cad. Saúde Pública*. 23 (2007) S529-S536.
- [11] J.I. Levy, S.L. Greco, J.D. Spengler. The importance of population susceptibility for air pollution risk assessment: A case study of power plants near Washington, DC. *Environmental Health Perspectives*. 110 (2002) 1253-1260.
- [12] W.K. Pokale. Effects of thermal power plant on environment. *Sci. Revs. Chem. Commun*. 2 (2012) 212-215.
- [13] T. Ugarte-Avilés, C. Manterola, C. Cartes-Velásquez, R. Otzen, T. Impact of proximity of thermoelectric power plants on bronchial obstructive crisis rates. *BMC Public Health* (2017) 17:96
- [14] P.V. Garcia, D. Linhares, A.F.S. Amaral, A.S. Rodrigues. Exposure of thermoelectric power-plant workers to volatile organic compounds from fuel oil: Genotoxic and cytotoxic effects in buccal epithelial cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 747 (2012) 197–201.
- [15] M. Celik, L. Donbak, F. Unal, D. Yuzbasoglu. Aksoy, H. Yılmaz, S. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutation Research*. 627 (2007) 158–163
- [16] A.P.S. Menezes, J. Silva, J. Roloff, J. Reyes, R. Debastiani, J.F. Dias, P. Rohr, A.B.F. Ferraz. *Baccharis trimera* (Less.) DC as genotoxicity indicator of exposure to coal and emissions from a Thermal power plant. *Arch Environ Contam Toxicol*. 65 (2013) 434–441.

6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstraram que a metodologia do ensaio cometa aplicada com *Drosophila melanogaster* foi sensível à detecção de danos genéticos provocados pelos efeitos da poluição.

Foram observadas diferenças significativas entre o ambiente rural e ambiente urbano de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Através da medida de material particulado, observou-se que o ambiente considerado rural se mostrou menos poluído em relação ao ambiente urbano. Também pôde-se observar que no intervalo de dois anos os danos genéticos aumentaram, reflexo da poluição, porém apenas nos indivíduos expostos ao ambiente urbano. Estes resultados servem de alerta aos residentes e trabalhadores da área central de Vitória de Santo Antão. Estes estão sujeitos a grandes prejuízos ao nível do DNA por estarem expostos diariamente aos compostos poluentes produzidos pelo intenso e crescente tráfego de veículos no local.

O estudo também demonstrou que os poluentes atmosféricos associados às usinas Termelétricas de Pau Ferro I, Termomanaus e Pernambuco III, inseridas na Área de Proteção Ambiental (APA) Aldeia Beberibe, foram capazes de provocar danos no material genético nos organismos expostos ao local mais próximo (0,7 km) das usinas, no período de maior funcionamento, em 2016. Os resultados sugerem que as fontes poluentes emitidas pelas usinas poder contribuir de forma significativa para um efeito genotóxico em organismos expostos, mesmo que na região exista uma grande área verde de preservação. Além disso, os resultados abrem perspectivas para a continuidade dos estudos no entorno de termelétricas no Brasil, que são pouco estudadas em relação a genotoxicidade ambiental, sugerindo o amplo uso de organismos bioindicadores como a *Drosophila melanogaster*.

Por fim, os resultados servem de alerta para a necessidade da implementação de medidas mitigadoras para reduzir o nível de poluição nos locais estudados, tendo em vista que a poluição atmosférica pode causar sérios danos à saúde humana e ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, mar. 2000.
- ALVES, C.A. et al. Chemical profiling of PM10 from urban road dust. **Science of the Total Environment** v. 634, p. 41-51, abr. 2018.
- AMORIM, E.M. **Estudo da mutagenicidade de metabólitos secundários liquênicos, utilizando o teste SMART e Ensaio Cometa em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, 2016.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.
- ANEEL. **Banco de informações de geração de energia elétrica.** 2018. Disponível em:<<http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/Combustivel.cfm>> acesso em : 15/01/2018.
- ANGEOLETTO, F. et al. Tipología Socio-Ambiental de las Ciudades Medias de Brasil: Aportes para un Desarrollo Urbano Sostenible. Urbe. **Revista Brasileira de Gestão Urbana**, v. 8, n. 2, p. 272-287, abr. 2016.
- ARBEX, M.A. et al. Queima de Biomassa e efeitos sobre a saúde. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 2, p. 158-175, abr. 2004.
- AZQUETA, A., COLLINS, A.R. The essential Comet Assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949-968, jun. 2013.
- BAIRD, C.; CANN, M., Química Ambiental. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.
- BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. Biomarkers for monitoring adverse health effects of air pollution in humans. *Journal of Translational. Toxicology*, v.1, n.1, p. 46-51, mar. 2014.
- BARSIENÉ, J. et al. Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in mussels before and after an oil spill at the marine oil terminal in the Baltic Sea. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.184, n. 4, p. 2067-2078, abr. 2012.
- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415, n. 3, p. 167-184, jul.1998.
- BENFORD D.J. et al. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 28, n. 1, p.119-131, jan. 2000.

- BERNARDES, A.P.; AZEVEDO, D.A.; ALMEIDA, T.W.J. Sistema De Monitoramento e Qualidade do Ar com Raspberry Pi. **Revista Científica Eletrônica UNISEB**, v. 2, n. 3, p. 200-220, jan-jul. 2014.
- BOCCHI C.; BAZZINI, C.; FONTANA, F.; PINTO, G.; MARTINO, A.; CASSONI, F. Characterization of urban aerosol: seasonal variation of mutagenicity and genotoxicity of PM_{2.5}, PM₁ and semi-volatile organic compounds. **Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** v. 809, p. 16-23, out. 2016.
- BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. (2014). Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. 2013. Brasília: SNSA/MCIDADES. 181 p.
- CANSARAN-DUMAN, D. Study on accumulation ability of two lichen species Hypogymnia physodes and Usnea hirta at iron-steel factory site, Turkey. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, n.6. p. 839-844, nov. 2011.
- CARNEIRO, R.M.A. **Bioindicadores vegetais de poluição atmosférica: uma contribuição para a saúde da comunidade**. 2004. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Enfermagem em Saúde Pública, 2004.
- CASTRO, I.F.A. **Avaliação da atividade genotóxica da radiação natural presente na cidade de Lajes Pintadas, Rio Grande do Norte, em *Drosophila melanogaster***. 2016. Dissertação (Mestrado), Universidade de Pernambuco, Biologia Celular e Molecular Aplicada, 2016.
- CELIK, M. et al.,. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. **Mutation Research**, v. 627, n. 2, p. 158–163, mar. 2007.
- CESAR, G. C. A.; NASCIMENTO, C. F. L.; CARVALHO, A. J. Associação entre exposição ao material particulado e internações por doenças respiratórias em crianças. **Revista de Saúde Pública**, v.47, n. 6, p.1209-1212, ago. 2013.
- CIVETTA M.T.M.; CIVETTA J.D. Carcinogénesis. **Salud Publica de Mexico**, v. 53 , n. 5, p.405-415, out. 2011.
- COLLINS A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research**, v. 759, p. 27-39, jan-mar. 2014.
- COLLINS, A.R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p.143–151, mai. 2008.
- DAVID, J. R.; CAPY, P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. **Trends in Genetics**, v. 4, n.4, p. 106-111, abr.1988.

DETRAN-PE, 2018. (Departamento Estadual de Trânsito de Pernambuco). Estatística da frota de veículos segundo os municípios - Pernambuco. 2018. Disponível em:

<http://www.detran.pe.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=36&Itemid=72> acesso em: 30/01/2018.

DOKE, S.K.; DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223-229, jul. 2015.

DOUKI, T. et al. Comparative study of diesel and biodiesel exhausts on lung oxidative stress and genotoxicity in rats. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 514-524, abr. 2018.

EBRASIL – EBRASIL Energia, 2017

EPA (**Environmental Protection Agency**, 2015

EPA (**Environmental Protection Agency**, 2017

FERETTI D. et al. Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy: the protocol of the prospective cohort MAPEC study. **Journal of Neuro Interverntional Surgery**, v 4, n.9, p. 1-8, set. 2014.

FESTING M.F.W. et al. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 26, n. 3, p. 283-301, mai-jun. 1998.

FORASTIERE, F. et al. Respiratory cancer mortality among workers employed in thermoelectric power plants. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v.15, n.6, p. 383-386, dez. 1989.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. 1949. **Introdução ao estudo da *Drosophila***. Cultus 5:1-70

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

GARCIA, P.V; LINHARES, D.; AMARAL, A.F.S.; RODRIGUES, A.S. Exposure of thermoelectric power-plant workers to volatile organic compounds from fuel oil: Genotoxic and cytotoxic effects in buccal epithelial cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.747, v. 2, p.197–201, set. 2012.

GAVINIER, S.; NASCIMENTO, C. F. L. Poluentes atmosféricos e internações por acidente vascular encefálico. **Revista Ambiente & Água**, v. 9, n. 3, p. 390-401, jul. 2014.

GILBERT, L.I. *Drosophila* is an inclusive model for human diseases, growth and development. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 293, n. 1-2, p. 25-31, out. 2008.

GODSCHALK, R.W.; *et al.* DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutation Research**, v. 757, n.1, p. 60-67, out. 2013.

GÓMEZ-ARROYO, et al. In situ biomonitoring of air quality in rural and urban environments of Mexico Valley through genotoxicity evaluated in wild plants. **Atmospheric Pollution Research**, v. 9, p. 119-125, jan. 2018.

GOUVEIA, N.; FREITAS, C.U; MARTINS, L.C.; MARCILIO, I.O. Hospitalizações por causas respiratórias e cardiovasculares associadas à contaminação atmosférica no Município de São Paulo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 12, p. 2669-77, dez. 2006.

GREENSPAN, R. J. **Fly Pushing - The Theory and Practice of Drosophila Genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2004.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Demográfico, 2016.

IEMA (Instituto de Energia e Meio Ambiente) **Termoeletricidade em Foco: Geração termelétrica e emissões atmosféricas: poluentes e sistemas de controle**. Instituto de Energia e Meio Ambiente, São Paulo, 2016. Disponível em <http://www.energiaeambiente.org.br/wpcontent/uploads/2016/11/iema-emissoes.pdf> Acesso em: 24/01/2018.

IMANIKIA S. et al. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 45, p. 356-361, jul. 2016.

J.I. LEVY, J.I; GRECO, S.L; SPENGLER, J.D. The importance of population susceptibility for air pollution risk assessment: A case study of power plants near Washington, DC. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n.12, p. 1253-1260, dez. 2002.

JOHNSTON, D. S. The art and desing of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. **Nature**, v. 3, n. 3, p. 176-188, mar. 2002.

LEANDRO, D.SW, ANGIOLLETO, F. Poluição atmosférica em cidades médias: uma proposta de avaliação para Rondonópolis-MT. **Revista Espaço Acadêmico**, v.17, n.198, p. 122-130, nov. 2017.

LEMOS, A.T. et al. Mutagenicity of particulate matter fractions in areas under the impact of urban and industrial activities. **Chemosphere**. v.89, n.9, p. 1126-1134, nov. 2012.

LENZ, S. et al. *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, n. 4, p. 453-460, nov. 2013

- LÓPEZ, M.L. et al. Elemental concentration and source identification of PM10 and PM2.5 by SR-XRF in Córdoba City, Argentina. **Atmospheric Environment** v. 45, n. 41, p. 5450-5457, out. 2011.
- LOURENÇO, S. R., **Gás natural: Perspectivas e utilização**. 2013. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Planejamento de Sistemas Energéticos, 2003.
- MAIOLI, O. L. G. et al. Foliar analyses of biochemical parameters of *Licania tometosa* (Benth) and *Bauhinia forficata* (Link.) species for air quality assessment. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.1925-1932, nov. 2008.
- MARCILIO, I.; GOUVEIA, N. Quantifying the impact of air pollution on the urban population of Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n.4, p. S529-S536, fev. 2007.
- MARTINS, L. C. et al. Air pollution and emergency room visits due to pneumonia and influenza in São Paulo, Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 36, n.1, p. 88-94, fev. 2002.
- MENEZES, A.P.S. et al. *Baccharis trimera* (Less.) DC as Genotoxicity Indicator of Exposure to Coal and Emissions from a Thermal Power Plant. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 3, p. 434–441, out. 2013.
- MEYER S. et al. Arsenic-containing hydrocarbons are toxic in the *in vivo* model *Drosophila melanogaster*. **Metallomics** v. 6, n. 11, p. 2010-2014, nov. 2014
- MØLLER, P. et al. Applications of the comet assay in particle toxicology: air pollution and engineered nanomaterials exposure. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 67-83, jan. 2015.
- MOLNÁR, P.; JANHALL, S.; HALLQUIST, M. Roadside measurements of fine and ultrafine particles at a major road north of Gothenburg. **Atmosphere Environment**, v. 36, n. 25, p. 4115-4123, set. 2002.
- MORAES-FILHO, A.V. et al. *In vivo* genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in their clinical combinations in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research - Genetic Toxicology Environmental**, v. 820, p. 31-38, ago. 2017.
- MUSSALI-GALANTI, P. et al. Genetic Structure and Diversity of Animal Populations Exposed to Metal Pollution. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology** v. 227, p.79-106, jan. 2014.
- NANDHAKUMAR, S. et al. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p.107-111, abr. 2011.
- NARDOCCIL, A.C. et al. Air pollution and respiratory and cardiovascular diseases: a time series study in Cubatão, São Paulo State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 9, p.1867-1875, set. 2013.

- NEETHU, C.B.; SHIBU VARDHANAN, Y. Effect of minerals on free radicals induced damages in *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Toxicological and Pharmacological Research** v. 8, n. 5, p. 346-352, jan. 2016
- NEHR, S.; FRANZEN-REUTER, I.; KUCEJKO, C. New directions: Future approaches to the standardized assessment of airborne pollutants affecting environmental quality. **Atmospheric Environment**, v. 166, p. 570-572, out. 2017.
- NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, v.3, n.3, p. 1-8, out.,2015.
- NORONHA, E.A.P. **Análise das potencialidades e vulnerabilidades socioambientais decorrentes do processo da industrialização no município de Vitória de Santo Antão – PE**. 2013. Dissertação (Mestrado), Universidade de Pernambuco, Gestão do Desenvolvimento Local Sustentável, 2013.
- OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: A review. **Mutation Research**, v. 567, n. 2-3, p.109–149, nov. 2004.
- OLIVEIRA, I. G., et al. Avaliação comparativa dos efeitos tóxico-genéticos da própolis em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, portadoras de diferentes níveis de enzimas de metabolização. **Revista de Biologia Neotropical**. v. 4, n.1, p. 64-69, nov. 2007.
- OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. I Up Date: Os impactos da poluição do ar na saúde humana. V Modelo Intercolegial da Organização das Nações Unidas, 2000.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.123, n.1, p. 291-298, ago. 1984.
- PEDROSO, A. N. V. 2007. Poluentes Atmosféricos & Plantas Bioindicadoras. In: **Curso de Capacitação de Monitores e Educadores**. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.
- PERAZA-VEJA, R.I. et al. Assessing genotoxicity of diuron on *Drosophila melanogaster* by the wing-spot test and the wing imaginal disk comet assay. **Toxicology and Industrial Health**, v. 33, n. 3, p. 443-453, mai. 2016.
- PEREIRA, B.B., et al. Biomonitoring air quality during and after a public transportation strike in the center of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil by *Tradescantia* micronucleus bioassay.

Environmental Science and Pollution Research International, v. 21, n. 5, p. 3680-3685, mar. 2014.

PERES, L.A.P.; NOGUEIRA, L.A.H.; TORRES, G.L. 2013 . **Impactos das emissões atmosféricas provocadas por geradores diesel em estudos de fontes de energia no meio rural**. In: Encontro de Energia no Meio Rural, UNICAMP, 2013.

POKALE, W.K. Effects of thermal power plant on environment. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, v. 2, n. 3, p. 212-215, mar., 2012.

RAINHO, C.R. et al. Biomonitoring of tunnel workers exposed to heavy air pollution in Rio de Janeiro, Brazil. **Air Quality, Atmosphere and Health**, v. 9, n.8, p. 881-886, dez. 2016.

REDLARSKI, G. et al. The influence of electromagnetic pollution on living organisms: historical trends and forecasting changes. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 234098, p. 1-18, jan. 2015.

SALOMON, K. R., **Avaliação quantitativa do impacto ambiental das emissões gasosas e do uso da água de resfriamento em instalações de geração elétrica**. 2003. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Itajubá, Engenharia de Energia, 2003.

SANTANA, S.L. **O Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* como bioindicador da poluição atmosférica em uma área urbana e rural**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

SIDDIQUE, H.R. et al. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.46, v.3, p.189-197, out. 2005.

SILVA, A.S. **Avaliação da atividade mutagênica dos compostos 4-aminopirimidínicos através do Ensaio Cometa e teste SMART em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2016. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.

SILVA, C.M.A.; MATTOS, I.E.; IGNOTTI, E.; HACON, S.S. Material particulado originário de queimadas e doenças respiratórias. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 2, p. 345-52, nov. 2013.

SILVA, I. M. Gás natural: a sua utilização na geração de energia elétrica no Brasil. **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 1, n. 1, p. 103-107, 2010.

SILVA, J. et al. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 241-245, mar. 2000.

- SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988.
- SMODIS, B.; BLEISE, A. Internationally harmonized approach to biomonitoring trace element atmospheric deposition. **Environmental Pollution**, v. 120, n.1, p. 3-10, fev. 2002.
- SOUZA, P.A. et al. Caracterização do material particulado fino e grosso e composição da fração inorgânica solúvel em água em São José dos Campos (SP). **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1247-1253, mai. 2010.
- TEIXEIRA, E.C; FELTES, S; SANTANA, E.R.R. Estudo das emissões de fontes móveis na Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande Do Sul. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 244-248, jan. 2008.
- UGARTE-AVILÉS, T.; MANTEROLA, C.; CARTES-VELÁSQUEZ, R.; OTZEN, T. Impact of proximity of thermoelectric power plants on bronchial obstructive crisis rates. **BMC Public Health**, v. 17, n. 1, p. 1-7, jan. 2017.
- VERAS, M.M.; CALDINI, E.G.; DOLHNIKOFF, M.; SALDIVA, P.H. Air pollution and effects on reproductive-system functions globally with particular emphasis on the Brazilian population. **Jornal Toxicol Environ Health B Crit Ver**, v.13, n.1, p.1-15, jan. 2010.
- VERÇOSA C.J. **Aplicação do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação da genotoxicidade ambiental**. 2015. Dissertação (Mestrado), Universidade de Pernambuco, Biologia Celular e Molecular Aplicada, 2015.
- VERÇOSA, C.J. et al. Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.141, p.148-153, jul. 2017.
- VERÇOSA, C.J.; CASTRO, I.F.A.; GARCIA, A.C.L.; ROHDE, C. An efficient rearing population cage to expose Drosophilids to various environmental agents. **Drosophila Information Service**, v. 98, p. 144-145, dez. 2015.
- WATSON, J.G., CHOW, J.C. Source characterization of major emission sources in the Imperial and Mexicali Valleys along the US/Mexico border. **The Science of the Total Environment**, v. 276, p. 33-47, ago. 2001.
- WILSON, A. M.; SALLOWAY, J. C.; WAKE, C. P; KELLY T. Air pollution and the demand for hospital services: a review. **Environment International**, v. 30, n. 8, p. 1109-1118, out. 2004.