



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

EDSON FRANCISCO DO CARMO NETO

**EFEITO GENOTÓXICO DA CONTAMINAÇÃO DE FONTES HÍDRICAS POR
METAIS PESADOS E RADÔNIO NO SEMIÁRIDO POTIGUAR**

Vitória de Santo Antão

2019

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

EDSON FRANCISCO DO CARMO NETO

**EFEITO GENOTÓXICO DA CONTAMINAÇÃO DE FONTES HÍDRICAS POR
METAIS PESADOS E RADÔNIO NO SEMIÁRIDO POTIGUAR**

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: Profa. Dra. Claudia Rohde

Vitória de Santo Antão

2019

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Fernanda Bernardo Ferreira, CRB4/2165

C287e Carmo Neto, Edson Francisco do
Efeito Genotóxico da contaminação de fontes hídricas por metais pesados e Radônio no semiárido Potiguar/ Edson Francisco do Carmo Neto. - Vitória de Santo Antão, 2019.
76 folhas; fig.

Orientadora: Claudia Rohde.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2019.
Inclui referências.

1. Genotoxicidade. 2. Contaminação Ambiental. 3. Drosophila melanogaster. 4. Metais Pesados. I. Rhode, Cláudia (Orientadora). II. Título.

363.738 4 CDD (23.ed.) BIBCAV/UFPE-014/2019

EDSON FRANCISCO DO CARMO NETO

**EFEITO GENOTÓXICO DA CONTAMINAÇÃO DE FONTES HÍDRICAS POR
METAIS PESADOS E RADÔNIO NO SEMIÁRIDO POTIGUAR**

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

Aprovado em: 18/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Oliveira Santos (Examinador Externo)
Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste

Prof. Dra. Zilpa das Graças Silva de Melo (Examinadora Externa)
Companhia Pernambucana de Saneamento

Dedico está conquista primeiramente a Deus como citado em seu I mandamento, segundo ao meu pai (*in memoriam*) e minha mãe pela minha educação, ao meu irmão, minha amada noiva e a todos aqueles que me incentivaram nesta etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me proporcionado a capacidade e força para superar dificuldades e continuar de pé.

Ao meu pai Raimundo Edson (*in memoriam*) por tudo que me ensinou e que mesmo com seu pouco estudo sempre nos incentivou a estudar, à minha mãe Helena Pereira pelo incentivo e apoio imensuráveis durante toda minha caminhada, ao meu irmão Eduardo Pereira o qual participou até de coletas. Aos demais familiares Carla Cristiane, Elves Carlos, Elton Carlos, Maria Pereira, pelo apoio.

A Rayany Araújo minha amada noiva, que está junto a mim em todas situações, agradeço por acreditar junto comigo que tudo vai dar certo, que tudo acontece na hora certa, por me incentivar nos momentos difíceis, por entender as ausências e alguns momentos de tensão que irremediavelmente acontecem, pelo incondicional apoio em todas as fases, por toda força, por todo amor, enfim, por ter você comigo sempre.

À Dra. Claudia Rohde, orientadora na execução deste trabalho, agradeço imensamente a oportunidade a qual me deu ao abrir as portas do laboratório e permitir que eu fizesse o mestrado sob sua orientação. Foi e ainda é uma grande honra e orgulho tê-la como orientadora, com inegável apoio de orientação e logística na execução de todo trabalho.

A todos os membros do Laboratório de Genética do CAV/UFPE, principalmente ao grupo da Mutagênese, em especial: André Silva, Cícero Verçosa, Érima Amorim, Rafaela Alves, Samuel Lima, Gislaíne Pereira e Lizandra Ferraz, pelo apoio recíproco nos experimentos.

Aos amigos conquistados durante a graduação e que persistem até hoje nos apoiando em todas as ocasiões André Deyvson, Ricardo Sérgio e Samuel Lima, que nossa amizade permaneça sempre nessa forte parceria.

À Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico da Vitória, corpo docente e funcionários da Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente e ao imprescindível apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela oportunidade de concretizar o mestrado.

Ao apoio e parceria do CRCN/NE na execução de experimentos, principalmente em nome de Elvis De França e Déric Soares. Pela paciência e valorosa disposição em se prestarem a ensinar e realizar testes e análises sempre que necessário.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A contaminação das fontes de água doce são um sério problema ambiental e faz-se necessária a caracterização de seus efeitos em diferentes organismos presentes no meio ambiente. Neste estudo foi avaliado por meio da aplicação do ensaio cometa em *Drosophila melanogaster*, o potencial efeito genotóxico do gás radônio e dos metais pesados presentes em águas da rede de abastecimento, poços domésticos e açude dos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas, Rio Grande do Norte, Brasil. Foi utilizada Cintilação Líquida de Ultra-Baixa Radiação de Fundo (CLUBR) para a quantificação de ^{222}Rn , e Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) para a determinação de metais pesados (Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn). Os drosofilídeos foram expostos ao meio de cultivo hidratado com águas coletadas nos locais de estudo, por um período de 24 horas, até atingirem o terceiro estágio larval. A hemolinfa foi extraída de 60 larvas de cada um dos experimentos, que foi realizado em triplicata e repetido em duas estações de 2018 (chuvosa e de estiagem). Um grupo controle negativo tratado com água destilada, e um controle positivo tratado com ciclofosfamida também foi preparado. Os resultados do ensaio cometa foram analisados pelo Índice de Dano e Frequência de Dano, em conjunto com análises quantitativas dos níveis de radônio e da presença de 11 metais pesados. De forma geral, os resultados apontaram o significativo efeito genotóxico para todas as amostras coletadas de torneira e poço na estação chuvosa, em ambas as cidades. As amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas coletadas na estação de estiagem apresentaram efeito genotóxico quando comparados ao grupo controle negativo. Análises quantitativas dos níveis de radônio revelaram concentrações próximas ao limite para consumo humano ($11,1 \text{ Bq.L}^{-1}$) nas águas de poços ($1,2$ a $10,6 \text{ Bq.L}^{-1}$). Além disso, foram determinadas concentrações acima do permitido de alumínio (de $0,11$ a $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) e de manganês (de $0,13$ a $0,14 \text{ mg.L}^{-1}$) em amostras de torneiras e açude de Parelhas. Os resultados indicam que há riscos genotóxicos associados a contaminação das fontes de água estudadas, especialmente na água da rede de abastecimento dos municípios. Devido à inerente complexidade da água, medidas de Radônio e de onze metais pesados não estiveram claramente associados a este resultado, o que indica a necessidade de mais estudos de outras fontes poluidoras da qualidade da água consumida pela população.

Palavras-chave: Contaminação Ambiental. *Drosophila melanogaster*. Ensaio cometa. Radônio. Metais pesados.

ABSTRACT

Contamination of freshwater sources is a serious environmental problem and it is necessary to characterize its effects on different organisms present in the environment. The potential genotoxic effect of the radon gas of the heavy metals present in waters of the state supply network, domestic wells and reservoir of the municipalities of Lajes Pintadas and Parelhas, Rio Grande do Norte state, Brazil, was evaluated using the Comet assay in *Drosophila melanogaster*. Was used Ultra-Low Background Liquid Scintillation Counter (CLUBR) was used for the quantification of ^{222}Rn , and Graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GFAAS) for the determination of heavy metals (Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn). The drosophilids were exposed to the culture medium, hydrated with water collected at the sites, for a period of 24 hours, until reaching the third larval stage. Hemolymph was extracted from 60 larvae of each of the experiments, which was performed in triplicate and repeated in two seasons of 2018 (rainy and dry season). A negative control group treated with distilled water, and a positive control treated with cyclophosphamide was also prepared. The results of the comet assay were analyzed for the Damage Index and Damage Frequency, together with quantitative analyzes of the levels of radon and the presence of 11 heavy metals. In general, the results pointed out the significant genotoxic effect for all samples collected from tap water and well, in the rainy season, in both cities. The water samples from the Boqueirão de Parelhas dam collected in the dry season presented genotoxic effect when compared to the negative control group. Quantitative analyzes of radon levels revealed concentrations close to the limit for human consumption (11.1 Bq.L^{-1}) in well water (1.2 to 10.6 Bq.L^{-1}). In addition, concentrations of aluminum (from 0.11 to 0.25 mg.L^{-1}) and manganese (from 0.13 to 0.14 mg.L^{-1}) were determined above the permitted limits in samples of tap water and Parelhas dam. The results indicate that there are genotoxic risks associated with the contamination of the water sources studied, especially in the water supply network of the municipalities. Due to the inherent complexity of water, measurements of radon and eleven heavy metals were not clearly associated with this result, which indicates the need for further studies of other sources polluting the quality of water consumed by the population.

Key words: Environmental Contamination. *Drosophila melanogaster*. Comet Assay. Radon. Heavy Metals.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica
ANOVA	Análise de Variância
Bq	Becquerel
C	Celsius
CLUBR	Cintilação Líquida de Ultra-Baixa Radiação de Fundo
cm	Centímetro
CAERN	Companhia de Águas e Esgotos do Rio Grande do Norte
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
<i>D.</i>	<i>Drosophila</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Chama
FD%	Frequência de Dano
g/cm ⁻³	Grama por centímetro cúbico
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite
HCl	Ácido Clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-AES	Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma de Acoplamento Indutivo)
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma de Acoplamento Indutivo
ID	Índice de Dano
IRD	Instituto de Radioproteção e Dosimetria
km ²	Quilometro quadrado
L	Litro
LSC	Espectrometria de Cintilação Líquida
mA	Miliampere
mL	Mililitro
mg	Miligrama
μL	Microlitro
μg	Micrograma
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial de Hidrogênio iônico
RN	Rio Grande do Norte
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
UNSCEAR	United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation
USEPA	Unite States Environmental Protection Agency
V	Volt
XRF	Fluorescência de Raio X

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1	Açude Riacho da Cachoeira, em Lajes Pintadas – RN após longo período de seca.	15
Figura 2	Açude Riacho da Cachoeira em Lajes Pintadas, Rio Grande do Norte, Brasil.	16
Figura 3	Açude Boqueirão de Parelhas (A), registros de utilização de suas águas pela população local para consumo (B) e recreação (C).	17
Figura 4	Espectrômetro de Absorção Atômica, GTA 120 – AA240Z, da Varian.	20
Figura 5	Séries radioativas naturais.	21
Figura 6	Vials contendo coquetel cintilador e amostras de água coletadas para análises.	23
Figura 7	Espectrômetro de Cintilação Líquida, Quantulus 1220, da Perfin Elmer.	23
Figura 8	Adultos de <i>Drosophila melanogaster</i> . À esquerda a fêmea e a direita o macho, que é um pouco menor e possui o pente sexual (indicado pela seta).	24
Figura 9	Esquema da disposição das lâminas na cuba de eletroforese (A), evidenciando os polos negativo e positivo. Imagem de um nucleóide em microscópio de fluorescência indicando o sentido da migração do DNA fragmentado (B).	27

Artigo 1

Figura 1	Mapa do Brasil, com destaque para a região semiárida (cinza claro) e estado do Rio Grande do Norte (cinza escuro), com localização dos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas (pontos brancos).	43
Figura 2	(A) Momento da coleta da amostra de água para realizar o ensaio cometa e a espectrometria de absorção atômica por forno de grafite, para a análise de Radônio; (B) preparação das amostras de água para a análise dos metais pesados por espectrometria de cintilação líquida; (C e D) frascos utilizados para armazenar a água para os dois experimentos.	43
Figura 3	Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético (0 a 4) baseada no comprimento e quantidade de DNA dos cometas. As imagens foram obtidas de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> , coradas por GelRed™ e observadas em microscopia fluorescente. Fonte: Verçosa et al. (2017).	43
Figura 4	Valores médios de Índice de Dano (A) e Frequência de Dano (B) nos hemócitos de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> (Oregon-R) tratados com amostras de água (poço artesiano e torneira) coletadas na estação chuvosa e na estiagem, nos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas, Rio Grande do Norte, Brasil; e valores médios obtidos nos grupos controle negativo (tratado com água destilada) e controle positivo (tratado com ciclofosfamida).	44

Artigo 2

Figura 1	(A) Mapa do Brasil, com destaque para a região Nordeste (cinza claro), o estado do Rio Grande do Norte (cinza escuro) e a cidade de Parelhas (ponto branco); (B) Imagem do açude Boqueirão de Parelhas, durante a coleta realizada em agosto de 2018; (C) posição dos três pontos de coleta no açude (P1, P2 e P3).	60
----------	---	----

- Figura 2 (A) Procedimentos de coleta de água no açude Boqueirão de Parelhas, para realizar o ensaio cometa, a espectrometria de cintilação líquida e a absorção atômica em forno de chama e grafite; (B) preparação das amostras de água para a espectrometria de cintilação líquida; (C e D) frascos de vidro utilizados para o armazenamento e transporte das amostras de água. 60
- Figura 3 Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético (0 a 4) baseada no comprimento e quantidade de DNA dos cometas. As imagens foram obtidas de hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster*, corados por GelRed™ e observados em microscopia fluorescente, de acordo com Verçosa et al. (2017). 61
- Figura 4 Valores médios de Índice de Dano (A) e Frequência de Dano (B) obtidos no ensaio cometa com *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) submetidos às amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas (pontos P1, P2, P3), na estação chuvosa e na estiagem; e valores médios obtidos nos tratamentos controle negativo e controle positivo. Os valores de desvio padrão estão representados pelas linhas verticais no alto das colunas. 61

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1	Esquema de coleta e armazenamento das amostras até a realização dos devidos testes.	45
Tabela 2	Avaliação do dano genético em larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> (Oregon-R) submetidas a água destilada (controle negativo), ciclofosfamida (controle positivo) e às águas de torneira e poços de Lajes Pintadas e Parelhas, Rio Grande do Norte, Brasil.	46
Tabela 3	Análise pós teste de Bonferroni do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) após tratamento de <i>Drosophila melanogaster</i> dos grupos controle negativo, controle positivo e expostos às amostras de água coletados em Lajes Pintadas e Parelhas.	47
Tabela 4	Resultados da presença de Radônio, obtidos por espectrometria de cintilação líquida. Todas as amostras de água de torneira apresentaram valores no limite de detecção ($<0,3$) e não foram incluídos na tabela.	47
Tabela 5	Valores (mg.L^{-1}) de metais pesados obtidos por GFAAS e respectivos limites máximos permitidos pela WHO (2011) e pelo CONAMA (2005), com destaque (em vermelho) aos valores de alumínio acima dos permitidos. Demais amostras apresentaram concentrações de atividades menores que a atividade mínima detectável.	48

Artigo 2

Tabela 1	Avaliação do nível de dano genético em larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas ao controle negativo (água destilada), ao controle positivo (ciclofosfamida), a às águas do açude Boqueirão de Parelhas (Pontos 1 a 3), em duas estações do ano. Os valores são apresentados por réplica (a, b, c) e na média de cada tratamento.	62
Tabela 2	Análise estatística (pós teste de Bonferroni) dos valores médios do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos de <i>Drosophila melanogaster</i> controle negativo (água destilada), controle positivo (ciclofosfamida) e amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas (P1 a P3).	63
Tabela 3	Valores (mg.L^{-1}) de metais pesados obtidos nas amostras de água nos três pontos do açude de Boqueirão de Parelhas (réplicas a, b, c) em comparação com os limites máximos de cada metal, permitidos pela WHO (2011) e pelo CONAMA (2005). Destaque (em vermelho) aos valores de alumínio e manganês detectados acima do recomendado no ponto P1.	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2.OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Recursos hídricos no semiárido potiguar	15
3.2 Metais pesados como contaminantes	18
3.3 Determinação de elementos traços.....	19
3.4 Radônio como contaminante	20
3.5 Espectrometria de Cintilação Líquida de Ultra-Baixa Radiação de Fundo	22
3.6 <i>Drosophila melanogaster</i>	23
3.7 O ensaio cometa	25
4 ARTIGO 1	28
Estudo do efeito genotóxico de metais pesados e radônio em poços artesianos e água de torneira nos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas, no semiárido do Brasil	
5 ARTIGO 2	49
Investigação da contaminação por metais pesados, radônio, e níveis de genotoxicidade no açude Boqueirão de Parelhas, semiárido do Brasil	
6 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as fontes de água doce são extremamente propícias para diversos usos, porém, as características deste recurso natural renovável têm sido drasticamente atingidas pela poluição ambiental (BRASIL, 2006). Tal recurso é acometido especialmente nos estados da região Nordeste que, associados à escassez hídrica acentuada dos últimos anos, sofrem também com os processos de urbanização, industrialização e produção agrícola. Como reflexo das condições climáticas dominantes do semiárido e uma hidrografia pobre, em seus amplos aspectos, as condições hídricas são insuficientes para sustentar rios que se mantenham perenes nos longos períodos de ausência de precipitações (IBGE, 2019).

Frente à problemática da escassez nos municípios do Nordeste do Brasil foram construídos reservatórios, regionalmente chamados de açudes. Estes servem para tentar amenizar as consequências da seca, além de abastecer de água a população local, que a utiliza para atividades como a agricultura, irrigação e uso doméstico (DANTAS et al., 2014; IBGE, 2019). Além dos açudes, a população local também faz uso de poços artesianos que são abastecidos por águas subterrâneas e por águas recebidas pela empresa fornecedora local, a Companhia de Águas e Esgotos do Rio Grande do Norte (CAERN).

Estudos realizados nos principais reservatórios da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte revelaram sérios problemas de qualidade de água, incluindo a contaminação por metais pesados (MARCON et al., 2010; GARCIA et al., 2011). Metais pesados são assim caracterizados pela sua elevada massa, densidade maior que 5 g/cm^3 , número atômico maior que 20 e outras propriedades químicas, podendo ser naturalmente ativos e tóxicos na maioria das células. Nos sistemas biológicos, metais pesados têm a capacidade de interferir nas biomoléculas, na ativação de certos receptores, na regulação de canais iônicos, na sinalização celular e na transcrição de genes, potencializando, desta forma, a toxicidade a nível fisiológico, celular e molecular (MARCON et al., 2010; OSÓRIO, 2011).

No Nordeste do Brasil, a presença de metais pesados na água se agrava não só pela escassez e atividades antrópicas (como esgoto, agricultura e poluição), mas também pelo processo natural de decaimento do Urânio, sendo o gás radônio, seu derivado radioativo mais importante e amplamente estudado como poluente ambiental em todo mundo (BRITO, 2013). Assim, vários municípios da região semiárida, entre eles Lajes Pintadas e Parelhas, no Rio Grande do Norte, apresentam afloramentos rochosos característicos, que são abundantes em minerais radioativos, os radionuclídeos (CPRN, 2006).

Nas águas do Açude Riacho da Cachoeira, localizado no município de Lajes Pintadas RN/Brasil, verificaram-se altos índices de Radônio. De acordo com Dantas (2012) dos 26 pontos analisados sete foram caracterizados como fortemente radioativos (acima de 50 unidade de MACHE) e os demais, classificados como radioativos (entre 10 a 50 unidades de MACHE). Altos índices de Radônio ($191,2 \text{ Bq.L}^{-1} \pm 58$) foram detectados também no interior de residências ao entorno do açude (VERÇOSA et al., 2017). O radônio é um gás com potencial efeito carcinogênico em humano, relacionado principalmente com o câncer de pulmão quando inalados (DANTAS, 2012) e a órgãos do trato digestivos quando ingeridos junto à água contaminada (ICRP, 1999).

Em testes genotóxicos o organismo-modelo *Drosophila melanogaster* tem sido amplamente utilizado (GAIVÃO; SIERRA, 2014). É um inseto díptero que pertence à família Drosophilidae, a qual comporta mais de 4.200 espécies distribuídas em 75 gêneros. Na área da genética toxicológica esse modelo é bem aceito devido a facilidades de manipulação laboratorial, rápido ciclo de vida, facilidade na detecção de fenótipos, grande conhecimento sobre seu genoma e por ser um excelente modelo de estudos de doenças humanas (RAND, 2010; ROHDE, 2012; LENZ et al., 2013). Mais recentemente, esta espécie vem sendo utilizada como modelo de estudos genotóxicos por meio do Ensaio cometa (revisão em GAIVÃO; SIERRA 2014), com destaque aos trabalhos desenvolvidos por Verçosa (2015) e Santana et al. (2018) em testes sobre os efeitos da poluição atmosférica nas cidades pernambucanas de Recife e Vitória de Santo Antão. Os autores implementaram a metodologia com o organismo e também confirmaram a grande sensibilidade da espécie aos efeitos genotóxicos relacionados a áreas poluídas e mais urbanizadas.

Tendo *D. melanogaster* como organismo dos estudos, este trabalho implementou uma nova abordagem investigativa acerca dos riscos genotóxicos associados a contaminação dos recursos hídricos por metais pesados e por Radônio, proveniente do decaimento natural do Urânio, em dois municípios da região semiárida do Nordeste brasileiro. A abordagem com *D. melanogaster* foi feita a fim de estimar o risco de dano ao material genético das populações humanas locais, instigando e dando subsídios aos órgãos competentes para o controle da qualidade dos recursos hídricos oferecidos à população.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a contaminação de fontes de abastecimento hídrico (poços, torneiras e açudes) por metais pesados e radônio nos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas no semiárido potiguar, e seu o potencial efeito genotóxico sobre o organismo modelo *Drosophila melanogaster*.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar os potenciais riscos para a saúde humana da contaminação das fontes hídricas por meio do ensaio cometa em *D. melanogaster*;
- Quantificar a presença e concentração de onze metais pesados e de radônio, nas três diferentes fontes de abastecimento hídrico nas duas cidades estudadas;
- Correlacionar os níveis de danos ao DNA obtidos em cada um dos pontos de coleta com a presença de metais pesados e de radônio;
- Investigar os efeitos da estação do ano (chuvosa e de estiagem) sobre os resultados obtidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Recursos hídricos no semiárido potiguar

A região semiárida brasileira apresenta uma extensão territorial de 764.522 km², o que corresponde a aproximadamente 56% da área total do Nordeste (IBGE, 2010), com 1135 municípios distribuídos nesta área. Essa região semiárida apresenta uma realidade preocupante para a população local, que sofre não só com escassez hídrica acentuada dos últimos anos (**Figura 1**), mas também com os processos de urbanização, de industrialização e de produção agrícola que poluem o meio ambiente e as fontes hídricas. Diante dessa realidade, foi necessário construir reservatórios, regionalmente chamados de açudes, com o intuito de amenizar as consequências da seca, além de abastecer de água a população local, que as utiliza para atividades como a agricultura, irrigação e recreação. Contudo, estudos realizados nos principais reservatórios da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte revelaram sérios problemas de qualidade de água, incluindo a contaminação por metais pesados (MARCON *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2011) e a presença de fontes naturais de radônio, que assim como os metais pesados pode contaminar os reservatórios de água e, conseqüentemente, tornar-se um problema para a saúde humana (DANTAS *et al.*, 2017).

Figura 1. Açude Riacho da Cachoeira, em Lajes Pintadas – RN após longo período de estiagem.



Fonte: CARMO NETO, E. F., 2018.

O estado do Rio Grande do Norte (RN), juntamente com Ceará e Paraíba, são os estados que detêm o maior percentual de área no semiárido. RN tem 93,0 % de sua extensão territorial inserida na porção semiárida, onde situam-se 147 municípios, de um total de 167 (MEDEIROS et al, 2012; FIGUEIREDO; SARAIVA JÚNIOR; FIGUEIREDO, 2016). Dentre os municípios da mesorregião do Agreste do RN, ou Agreste Potiguar, destaca-se a cidade de Lajes Pintadas, que está situada a 340 m acima do nível do mar. Limita-se com os municípios de São Tomé, Campo Redondo e Santa Cruz. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), o município apresenta uma população de 4.614 habitantes. Segundo o Ministério de Minas e Energia, uma característica de grande importância no município de Lajes Pintadas é a presença de afloramentos rochosos com liberação de elementos radioativos naturais, que emitem o gás radônio e, conseqüentemente, o chumbo para o ambiente. A presença deste gás pode estar associada aos elevados índices de diversos tipos de câncer que assolam a população, como o de orofaringe, estômago e pulmão (SAMET, 2011).

Segundo Dantas et al. (2017), agentes ionizantes são encontrados solubilizados na água do açude do município em uma escala significativa e acima dos níveis aceitáveis pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Esse é o caso do açude Riacho da Cachoeira (**Figura 2**), um dos principais corpos d'água desta região, localizado na área urbana do município. A presença do gás radônio nas suas águas pode afetar direta e/ou indiretamente os organismos que nele habitam, assim como as populações que residem próximo a este açude (DANTAS et al., 2014), visto que é utilizado para abastecer de água a população local, nas atividades de agricultura, irrigação e recreação.

Figura 2. Açude Riacho da Cachoeira em Lajes Pintadas, Rio Grande do Norte, Brasil.



Fonte: CARMO NETO, E. F., 2018.

Outra cidade de interesse na mesma região é Parelhas, localizada na microrregião do Seridó Oriental, com área territorial de 513,507 km² e limitando-se com os municípios de Carnaúba dos Dantas, Equador, Jardim do Seridó e Santana do Seridó, além dos municípios paraibanos de Nova Palmeira, Pedra Lavrada e São Vicente do Seridó (PEREIRA, 2017). O município de Parelhas é composto por aproximadamente 20354 habitantes, sendo 17084 moradores da zona urbana e 3270 da zona rural, tendo como economia de base a produção ceramista, a agricultura, o comércio e a extração e comercialização de minérios (IBGE, 2010).

Nos primórdios, a economia do município baseava-se no cultivo do algodão e na pecuária, mas após a crise desses sistemas, as atividades de base mineral, como a mineração e a indústria de cerâmica vermelha, fortaleceram a economia municipal (ARAÚJO; SOUZA; SILVA, 2016). Isso graças às formações geológicas da cidade, que consistem em rochas cristalinas, sendo formadas por rochas resistentes como granitos, quartzitos, gnaisses e micaxistos (FELIPE; CARVALHO; ROCHA, 2011). Parelhas tem como um dos principais corpos de acumulação de água da cidade o açude Boqueirão de Parelhas (**Figura 3**), com capacidade de 85.012.000 m³, que é alimentado pelos rios Seridó e das Vazantes (PEREIRA, 2017).

Figura 3. Açude Boqueirão de Parelhas (A), registros de utilização de suas águas pela população local para consumo (B) e recreação (C).



Fonte: CARMO NETO, E. F., 2018.

Um estudo realizado por Chaves et al. (2016) com amostras de água de três pontos (P1: 6° 41' 6.662" S; 36° 37' 22.98" W, P2: 6° 41' 51.385" S, 36° 37' 43.997" W, e P3: 6° 43' 20.034" S; 36° 37' 39.22" W) do açude Boqueirão alertou sobre a presença de concentrações 2 a 30 vezes maiores que o limite máximo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (2011) de metais pesados como o alumínio, cobalto, chumbo, ferro, níquel e prata. Esse relato foi importante visto que o açude é amplamente utilizado pela população local, para os mais diversos fins.

3.2 Metais pesados como contaminantes

O termo metais pesados refere-se aos elementos e suas formas iônicas que pertencem ao grupo de transição e não transição da tabela periódica com densidade maior que 5 g/cm³ ou que possuem número atômico maior que 20 (GOMES; OSÓRIO, 2011). Dependendo de seu teor no ar, água, rochas ou sedimentos, bem como da forma como estão disponíveis para os seres vivos (a partir dos compartimentos solo, água e ar), os metais pesados podem ter sua concentração aumentada à medida que se avança nos níveis tróficos da cadeia alimentar, causando danos à saúde humana em função de sua toxicidade (ARAÚJO; SOUZA, 2012).

Segundo Rupp (1996), mesmo em concentrações reduzidas, os cátions de metais pesados, uma vez lançados no ambiente, como por exemplo, em rios, mares e lagoas, ao atingirem as águas de um estuário sofrem o efeito denominado de amplificação biológica. Este efeito ocorre em virtude desses compostos não integrarem o ciclo metabólico dos organismos vivos, sendo neles armazenados e, em consequência, sua concentração é extraordinariamente ampliada nos tecidos dos seres vivos que integram a cadeia alimentar do ecossistema resultando assim no seu efeito de bioacumulação.

Contudo, alguns metais pesados ou elementos traço (termo empregado por alguns autores) são ingeridos pela população de forma voluntária, estando eles contidos muitas vezes em suplementos vitamínico-minerais por serem considerados essenciais do ponto de vista biológico, enquanto outros não. Entretanto, mesmo aqueles tidos como essenciais podem, sob condições específicas, causar impactos negativos a ecossistemas terrestres e aquáticos, constituindo-se assim, em contaminantes ou poluentes do solo e da água (GUILHERME et al., 2005). Em sistemas biológicos, metais pesados têm a capacidade de interferir nas biomoléculas, na ativação de certos receptores, na regulação de canais iônicos, na sinalização celular e na transcrição de genes, potencializando, desta forma, a toxicidade a nível fisiológico, celular e molecular (MARCON et al., 2010).

Tais elementos vêm drasticamente acometendo fontes hídricas sejam de águas superficiais ou subterrâneas (JARUP, 2003). De acordo com Miller e colaboradores (2004) em comunidades ribeirinhas, uma das principais vias de acumulação de metais pesados em humanos é a ingestão de água potável contaminada. Entretanto os perigos da contaminação no meio hídrico não se restringem ao consumo direto da água (ROCHA; AZEVEDO, 2017), tal contaminação pode ser associada à utilização de fontes hídricas inapropriadas para a irrigação, o que conseqüentemente leva ao consumo de vegetais e hortaliças contaminadas. Em seu estudo Ahmad e Goni (2009) apontaram a contaminação de águas de irrigação por ferro, cádmio, cobre e chumbo por exemplo. O consumo de peixes criados nessas águas também favorece o efeito bioacumulativo de metais pesados em seres humanos. Um exemplo clássico de tóxico bioacumulativo é o metilmercúrio, que, presente na água, contamina os peixes e conseqüentemente todos os níveis tróficos superiores (SANTOS; GATTI; SOUZA, 2006).

3.3 Determinação de elementos traços

Das várias técnicas disponíveis para a determinação de elementos-traço, como por exemplo, a espectrometria de massas com fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS), espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-AES), espectrometria de fluorescência atômica (AFS), fluorescência de raios X (XRF), polarografia, voltametria, entre outras. A espectrometria de absorção atômica, seja em chama (FAAS), grafite (GFAAS) ou em atomizador eletrotérmico, é amplamente utilizada em análises de rotina em função de vários fatores: alta especificidade, sensibilidade, robustez, baixos limites de detecção para vários elementos em diferentes amostras e baixo custo relativo (FRESCHI et al., 2000).

A Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) envolve a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos gasosos no estado fundamental. A partir desse fenômeno são determinadas as quantidades dos elementos (metais ou não) em uma ampla variedade de amostras, podendo ser materiais biológicos ou ambientais (água, solo, sedimentos e plantas). A espectrometria de absorção atômica em chama é a técnica mais utilizada para análises elementares, em nível mg.mL^{-1} , enquanto que a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite é utilizada para determinação de baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g/L}$ (KRUG et al., 2004), assim, como as concentrações de contaminantes em água geralmente ocorre, em níveis traço, faz-se necessário, para detectá-los e quantificá-los, o uso de

técnicas analíticas de alta sensibilidade, como a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (WELZ; SPERLING, 1999; OSHITA et al, 2003).

A técnica de GFAAS (**Figura 4**) é utilizada em análises químicas de rotina em larga escala, tendo em vista vários fatores, como requerer pequenos volumes de amostra; o tubo de grafite age como um reator químico, análise direta em algumas matrizes (a decomposição prévia da amostra não é necessária); atinge excelentes limites de detecção após a separação do analito da matriz no tubo de grafite; apresenta caráter multielementar (até 6 elementos atualmente, mas com potencial para mais elementos com a proposta recente de espectrômetro com fonte contínua); rapidez; relativo baixo custo operacional; espectro simples; entre outros (PERKIN- ELMER, 1991).

Figura 4. Espectrômetro de Absorção Atômica, GTA 120 – AA240Z, da Varian.



Fonte: CARMO NETO, E. F., 2018

3.4 Radônio como contaminante

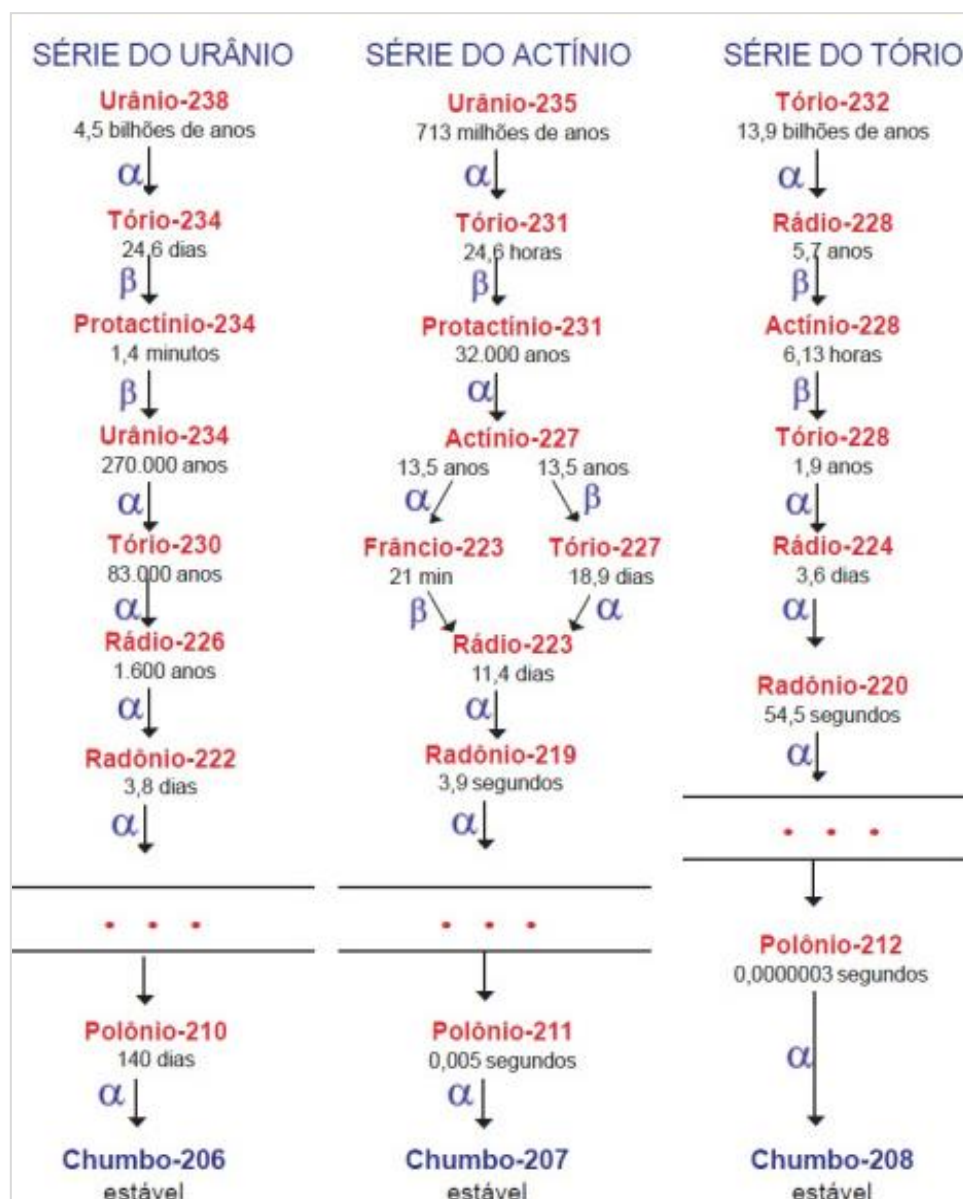
O radônio é um elemento químico da classe dos gases nobres. É invisível, insípido e inodoro quando em condições normais de temperatura e pressão. Porém, ao ser congelado apresenta-se brilhante (MAFRA, 2011). Naturalmente associado aos depósitos de urânio em solos, rochas e águas subterrâneas, podendo ser encontrado em rochas cristalinas e sedimentares, solos, minérios e dissolvido na água, sendo ainda o único descendente do urânio a se apresentar nas condições usuais de temperatura e pressão sob a forma de um gás (AMARAL, 2018; BRITO, 2013).

Segundo Brito (2013), o radônio se apresenta na natureza sob trinta e nove (39) isótopos diferentes, que vão desde o radônio-193 (^{193}Rn) até o radônio-231 (^{231}Rn). Conforme Corrêa (2006) o radônio consiste de três isótopos naturais abundantes:

- O Radônio (^{222}Rn) - isótopo mais estável, de meia-vida de 3,823 dias, faz parte da série do urânio, ^{238}U ;
- O Torônio (^{220}Rn) - com meia vida de 51,5s e pertencendo a série do tório, ^{232}Th ;
- O Actinônio (^{219}Rn) - da série do actínio, ^{235}U , têm meias-vidas de e 3,92s.

Cada um destes é proveniente das três séries de desintegração (urânio, tório e actínio), como mostrado na **Figura 5**.

Figura 5. Séries radioativas naturais.



Fonte: Disponível em: <https://qualidadeonline.wordpress.com/category/radioatividade/>. Acesso em: 20 out. 2018.

Os produtos resultantes do decaimento do radônio emitem partículas alfa que, ao serem inaladas, irradiam o trato respiratório e promovem lesões no DNA que podem resultar na carcinogênese (ZAMBONI, 2002). Mas nem só a inalação é preocupante para a população, pois segundo ICRP (1999) a ingestão de água rica em radionuclídeos primordiais é também uma causa da exposição prolongada adicional, acometendo neste caso os tecidos do trato digestivo, sendo o tecido das paredes do estômago o mais atingido pela radiação.

Por se tratar de um gás, o radônio produzido no interior das rochas e solos difunde-se com facilidade através de fissuras, tubulações e lençóis freáticos até alcançar a superfície terrestre (MARQUES; SANTO; GERALDO, 2004). No ambiente aquático, níveis mais altos de ^{222}Rn são encontrados em água subterrâneas e estão correlacionados à ocorrência de níveis elevados do seu precursor o ^{226}Ra nas rochas. Rochas cristalinas, especialmente granito, podem ser fontes dos níveis elevados do gás, enquanto que rochas sedimentares apresentam, geralmente, níveis inferiores (EISENBUD; GESELL, 1997).

3.5 Espectrometria de Cintilação Líquida de Ultra-Baixa Radiação de Fundo

A espectrometria de cintilação líquida (LSC) é um dos métodos mais sensíveis para a detecção e quantificação dos tipos mais comuns de decaimento nuclear (alfa, beta ou gama). Atualmente, é bastante usada por a análise de emissores α , o que permite realizar medidas precisas, com boa reprodutibilidade, em grande número de amostras (SALONEN; HUKKANEN, 1997; FORTE et al., 2003; OLIVEIRA, 2014). Para análise de alfa e beta total em águas naturais e para consumo humano, a abordagem mais comum é evaporar um volume conhecido de amostra e medir a atividade do resíduo. A técnica de espectrometria de cintilação em meio líquido tem sido apresentada como uma alternativa ao procedimento convencional usando contador proporcional de fluxo gasoso (MINGOTE; COSTA, 2016). Nessa técnica a amostra de água e o cintilador (**Figura 6**) são misturados homogeneamente (cintilador miscível), e a energia das radiações será absorvida pelo meio de três formas: térmica, iônica e excitação de moléculas da solução. Esta última excita os elétrons das camadas eletrônicas das moléculas do cintilador e estes, posteriormente, perdem a energia em excesso, emitindo fótons com intensidade proporcional à energia da radiação absorvida (OLIVEIRA, 2014).

Figura 6. Vials contendo coquetel cintilador e amostras de águas coletadas para análises.



Fonte: AMARAL, 2018.

A técnica de LSC (**Figura 7**) tem sido utilizada em diversos países com o propósito de avaliar a radioatividade em águas utilizadas para o consumo humano, podendo-se citar dentre outros: Austrália, Brasil, Estados Unidos, Finlândia, Itália, Kuwait, Portugal e Taiwan (BAKIR; BEM, 1996; RUSCONI et al., 2004; KLEINSCHMIDT, 2004; LOPES; MADRUGA; CARVALHO, 2005; SALONEN, 2006; RUBERU; LIU; PERERA, 2008; LIN et al., 2012; AMARAL, 2018).

Figura 7. Espectrômetro de Cintilação Líquida, Quantulus 1220, da Perkin Elmer.



Fonte: AMARAL, 2018.

3.6 *Drosophila melanogaster*

Drosophila é um dos gêneros de maior importância da família Drosophilidae (Diptera: Insecta), sendo a espécie *Drosophila melanogaster* (**Figura 8**) considerada um organismo-modelo em diversas áreas de estudo (ROHDE, 2012). Vários fatores fazem desse gênero um excelente modelo biológico, dentre eles o baixo custo em sua criação, claro dimorfismo

sexual, curto ciclo de vida, serem pequenos em tamanho, abundantes, facilmente coletados em ambientes naturais, facilidade na manipulação e na detecção de fenótipos. Em laboratório podem ser ainda facilmente cultivados em frascos contendo meio de cultura apropriado, fator que possibilitou a geração de grande conhecimento sobre sua biologia, genética e evolução (CRUZ; BELLÓN, 1983; TIDON, 2006; RAND, 2010).

Tal organismo, naturalmente encontra-se em torno de frutas em putrefação, por isso é também conhecido como mosca da fruta. Essa espécie tem ocorrência em diversos ecossistemas do mundo (BÄCHLI et al., 2018), inclusive no ambiente doméstico onde foi introduzida e transportada pelo homem para diversos ambientes (DAVID; CAPY, 1988). 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 8**) estrutura exclusiva dos machos, situada no primeiro par de patas (REEVE, 2001).

Figura 8. Adultos de *Drosophila melanogaster*. À esquerda a fêmea e à direita o macho, que é um pouco menor e possui o pente sexual (indicado pela seta).



Fonte: SATURNINO, 2012.

Distintos morfologicamente, *D. melanogaster* e *Homo sapiens* não apresentam uma grande semelhança, mas com o sequenciamento de ambos os genomas ficou claro que mais de metade dos genes de *D. melanogaster* o qual é distribuído em 8 cromossomos, sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual, sendo este XX para fêmeas ou XY para indivíduos machos que, no total, contêm aproximadamente 13.600 genes (ADAMS et al., 2000), tem homólogos em seres humanos. Este fato contribuiu para a importância de estudar este organismo nas investigações de efeitos biológicos e descobrir pontos

diretamente relevantes para os seres humanos (BECKINGHAM *et al.*, 2005). Além disso, esta espécie é extremamente sensível a alterações nas condições do seu habitat (TIDON, 2006), o que a torna funcional para uso em estudos de impactos causados por alterações ambientais.

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. Segundo cálculos de pesquisadores em um único século, este grupo deu motivos para que se escrevessem 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.

Trata-se de um organismo bastante empregado nas mais diversas investigações e cada vez mais utilizado para o estudo de doenças humanas (REDLARSKI *et al.*, 2015). Isso deve estar associado 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.

A mosca da fruta *D. melanogaster* é um organismo modelo que tem sido usado para testes de genotoxicidade *in vivo* de vários compostos químicos e poluentes ambientais. A mosca é particularmente adequada para estes estudos porque permite a detecção *in vivo* de várias lesões genéticas do nível molecular ao cromossômico (VOGEL *et al.*, 1983; ZIJLSTRA; VOGEL, 1988). Considerado também como organismo alternativo em pesquisa científica, tal espécie tem sido recomendada pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos – ECVAM (FESTING *et al.*, 1998; BENFORD *et al.*, 2000), com o intuito 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).

3.7 O ensaio cometa

Ensaio cometa é uma técnica rápida, acessível, muito sensível e eficiente que permite quantificar lesões e detectar os efeitos do reparo do DNA, provocada tanto por efeitos simples como estresse oxidativo, como de outros fatores genotóxicos (BELPAEME, COOREMAN, KIRSCH-VOLDERS, 1998; SILVA, 2003; SILVA, 2007; COLLINS *et al.*, 2008). De acordo com os trabalhos de Verçosa (2015) e Santana (2018) a metodologia do ensaio

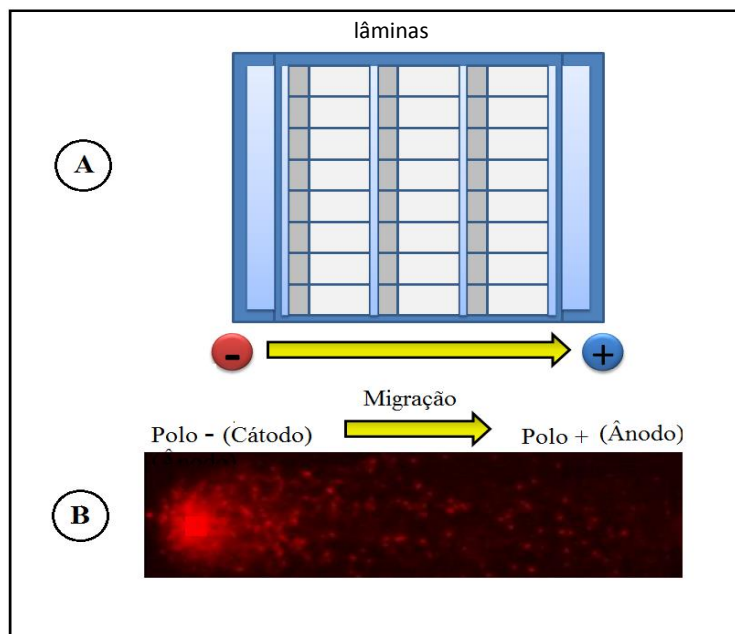
cometa é sensível à detecção de danos genéticos provocados pelos efeitos da radiação natural e da poluição atmosférica sobre células somáticas da hemolinfa de *D. melanogaster*.

As vantagens do ensaio do cometa incluem a sua simplicidade, rápida performance e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA. A simplicidade e a sensibilidade fazem dele um sistema adequado de teste para biomonitoramento dos níveis crônicos de exposição, podendo ser utilizado em inúmeras análises que avaliam células viáveis (BÜCKER; CARVALHO; GOMES, 2006). Permitindo 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). Estas análises envolvem a genética médica, genética toxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, medicina ambiental, ocupacional, biomonitoramento ambiental, entre outras (SILVA, 2007).

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; ROUBICEK, 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 9**). Quanto maior o dano 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 utilizando *Drosophila melanogaster* como organismo modelo (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, 2018). Por outro lado, o teste também tem sido aplicado para garantir a segurança do uso de compostos liquênicos (AMORIM, 2016); compostos pirimidínicos (SILVA, 2016), e de substâncias utilizadas como larvicidas no controle de espécies de mosquitos em Pernambuco.

Figura 9. Esquema da disposição das lâminas na cuba de eletroforese (A), evidenciando os polos negativo e positivo. Imagem de um nucleóide em microscópio de fluorescência indicando o sentido da migração do DNA fragmentado (B).



Fonte: SANTANA, 2018.

Para esta investigação foi utilizada a metodologia do Ensaio cometa já implementada no Laboratório de Genética do CAV-UFPE, juntamente com a Espectrometria de Cintilação Líquida de Ultra-Baixa Radiação de Fundo e a Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, realizadas no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), com a finalidade de aprimorar ainda mais as análises relacionadas aos riscos à saúde humana e ao meio ambiente, frente aos efeitos de agentes genotóxicos de fontes hídricas do semiárido do Brasil.

4 ARTIGO 1

A ser submetido à revista:

Environmental Science and Pollution Research

B1 (Biodiversidade), Fator de Impacto: 2,800



Efeito genotóxico da água de poços domésticos e da rede de abastecimento público de municípios do semiárido do Brasil e sua associação com radônio e elementos químicos tóxicos

Genotoxic effect of well and tap water of municipalities from the semi-arid region of Brazil and its association with radon and toxic chemical elements

Edson Francisco do Carmo Neto ^{ab}, Samuel Lima de Santana ^b, Érika Maria de Amorim ^b, Déric Soares de Amaral ^c, Alesxandro Francisco do Nascimento^c, Elvis Joacir De França ^c, Cristiano Aparecido Chagas ^a, Claudia Rohde ^{ab}

^a Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico da 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

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

Por se tratar de um recurso essencial a todas as formas de vida, a contaminação da água potável é um dos principais problemas deste século. No semiárido do Nordeste do Brasil, recursos hídricos tais como açudes e poços domésticos são afetados pela escassez e pela presença natural de radiação, um fenômeno geológico comum na região, decorrente do afloramento superficial de fontes naturais de Urânio. Para o uso seguro das fontes hídricas, faz-se necessário avaliar a presença de contaminantes, tais como metais tóxicos e Radônio (^{222}Rn), e os possíveis efeitos genotóxicos destes compostos sobre o material genético dos organismos. Contudo, é sabido que a matriz água é uma das mais complexas, com diversos níveis de interação química, física e biológica. Neste estudo, amostras de água de poços domésticos e da rede de distribuição coletadas nos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas, foram investigadas a partir de ensaios de toxicidade (ensaio cometa), Cintilação Líquida de Ultra-Baixa Radiação de Fundo - CLUBR para a quantificação de ^{222}Rn , e Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite - GFAAS para a determinação de Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn. Os locais estudados situam-se numa região geológica rica em radionuclídeos, denominada Província Pegmatítica da Borborema, no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. Células somáticas (hemócitos) do organismo-modelo *Drosophila melanogaster* foram obtidas de larvas em terceiro estágio cultivadas em meio hidratado com amostras de água de poços ($n = 2$) e de torneiras (dois pontos da rede de distribuição) dos dois municípios, coletadas em duas diferentes épocas do ano. Por meio do ensaio cometa, as amostras foram avaliadas quanto ao Índice de Dano e Frequência de Dano, em experimentos realizados em triplicatas. Os resultados demonstram potencial efeito genotóxico de todas as amostras coletadas na estação chuvosa, em ambas as cidades, e na amostra de torneira na cidade de Lajes Pintadas, na estação da estiagem. Entretanto, as concentrações de ^{222}Rn foram encontradas na ordem de 5,1 a 10,6 Bq.L^{-1} , sendo próximas ao limite de risco para consumo humano (11,1 Bq.L^{-1}), apenas nas águas de poços. Todos os elementos químicos mostraram concentrações abaixo dos limites permitidos, com exceção do alumínio, cujas concentrações estiveram acima do permitido pelo CONAMA (0,13 a 0,25 mg.L^{-1}) na amostra de água da rede de distribuição de Parelhas. Nas condições experimentais deste trabalho, os resultados do ensaio cometa indicam que as águas de poço artesiano e de torneira investigados na estação chuvosa oferecem riscos de dano genético se consumidos pelas pessoas e animais. Todavia, não estão claras as causas destas alterações devido à inerente complexidade da água. Os resultados apontam para a necessidade de mais estudos sobre os contaminantes e a geração de genotoxicidade observada em células somáticas de *D. melanogaster*.

Palavras-chave: Ensaio de cometa, hemócitos, radiação natural, genotoxicidade.

Introdução

Considerada um recurso natural indispensável, a água doce é um elemento essencial a vida de todas as espécies. Entretanto, este recurso natural pode vir a apresentar riscos à saúde humana devido à contaminação, um dos principais problemas surgidos neste século (Rocha et al., 2006; Chowdhury et al., 2016). A água pode ser afetada especialmente nos estados da região semiárida do Brasil, uma zona situada entre 2.5° S e 16.1° S e 34.8°W e 46°W, que cobre 18,26 % de todo território brasileiro. Nesta zona semiárida, que cobre cerca mais de 50% do Nordeste do Brasil, e onde vivem 56 milhões de habitantes, há uma rede hidrográfica insuficiente em aporte de chuvas para sustentar rios que se mantenham perenes em todo ano (Ab'Saber 1999). Isso afeta diretamente cerca de 24 milhões de habitantes que vivem no semiárido (IBGE, 2017), considerado a região mais densamente povoada do mundo (Ab'Saber, 1985; Marengo, 2008).

Entre os anos de 2010 e 2016, a região Nordeste sofreu intensamente com um fenômeno de escassez hídrica (Alvalá et al., 2017; Marengo et al., 2018). Nesta região, além dos problemas acima citados, recursos hídricos tais como açudes e poços são também afetados pela presença de radiação natural, um fenômeno geológico comum, decorrente do afloramento superficial de fontes naturais de Urânio, que compõe a Província Pegmatítica da Borborema (International Atomic Energy Agency, 2009). Por ser um átomo instável, o Urânio sofre decaimento e gera uma série de subprodutos, dentre eles o gás Radônio (^{222}Rn), que se solubiliza facilmente nas fontes hídricas, antes de chegar à atmosfera. A depender das suas concentrações, o Radônio pode ser altamente genotóxico (Campos et al., 2013; Marcon et al., 2017; Verçosa et al., 2017) e causar danos patológicos nas populações humanas, tais como o câncer (Wilson et al., 2014; Dobrzyński et al., 2015; Marcon et al., 2017).

Os estudos dos efeitos de radionuclídeos na saúde das populações que vivem em locais de risco e que estão expostas às fontes naturais de radiação são de fundamental importância para a compreensão do impacto de baixas doses de radiação ionizante de origem natural (Dobrzyński et al., 2015). Chama-se de radionuclídeo aquele elemento que é instável e passível de sofrer um processo chamado decaimento radioativo, quando um átomo espontaneamente libera energia de seu núcleo.

As fontes de águas subterrâneas representam 97% das reservas de água doce exploráveis do mundo, e mais da metade da população mundial é dependente de tais fontes (Giampá e Gonçalves, 2013). Estas águas, porém, podem apresentar problemas de qualidade, o que deveria limitar seu uso para diversos fins, devido a uma possível presença de radionuclídeos e também de metais pesados dissolvidos (Chaves et al., 2016; Dantas et

al., 2017). Os sistemas de abastecimento de água operados ou aqueles construídos inadequadamente podem comprometer a saúde da população, podendo, até mesmo, gerar surtos de doenças, transmitidas pela má qualidade da água (Tsutiya, 2006).

A água da rede de distribuição utilizada pela população de Lajes Pintadas e Parelhas é tratada e distribuída por empresa pública Estadual que estabelece definições e procedimentos sobre o controle de qualidade da água de sistemas de abastecimento, como a eliminação de impurezas e correção de algumas de suas propriedades. A empresa também institui mecanismos e instrumentos para divulgação de informação ao consumidor sobre a qualidade para o consumo (Silva et al., 2015) tendo o objetivo de contribuir para a melhoria da qualidade de vida de seus usuários.

Diversos trabalhos vêm demonstrando que o problema da contaminação de diversas fontes de abastecimento de água é recorrente e afeta diversos países, podendo se dar por elementos químicos resultante de atividades antrópicas e/ou por causas naturais, tais como os radionuclídeos presentes nos ambientes aquáticos (Moreira et al, 2012; Silva et al, 2015; Chaves et al, 2016). Na região Nordeste do Brasil, estudos vêm acompanhando a qualidade das águas. Amaral (2018), por exemplo, realizou o monitoramento da contaminação de poços artesianos por Radônio em cidades da Região Metropolitana do Recife, no estado de Pernambuco; e Silva e colaboradores (2015) avaliaram a qualidade da água distribuída para a população em um bairro da cidade de Natal, capital do estado do Rio Grande do Norte. Entre 2013 e 2014, Chaves et al. (2016) investigaram as águas do açude da cidade de Parelhas, detectando elevadas concentrações de alumínio, níquel, prata e chumbo. Os resultados corroboraram outros trabalhos, destacando que a contaminação dos recursos hídricos se dá pela presença de metais pesados e Radônio, que têm efeito genotóxico sobre o material genético dos organismos utilizados nos estudos (Chaves et al, 2016; Marcon et al, 2017; Dantas et al, 2017). Em nosso estudo, realizado em 2018, foram investigados os riscos genotóxicos da água consumida em Lajes Pintadas e Parelhas (poço doméstico e água da rede de distribuição) por meio do ensaio cometa, tendo *Drosophila melanogaster* como organismo modelo. Análises da contaminação por Radônio e por metais pesados foram também incluídos, a fim de mensurar e extrapolar o risco de dano ao material genético das populações locais.

Material e métodos

Área do estudo

Foram investigadas amostras de água de poços domésticos e da rede de distribuição dos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas, localizados no estado do Rio Grande do Norte

(RN) (**Figura 1**). Os locais estão inseridos numa zona semiárida do Nordeste do Brasil, nas quais temperaturas médias anuais são 28,1 °C (mínima de 21,0 °C e máxima de 33,0°C) em Lajes Pintadas e 27,5 °C (mínima de 18,0 °C e máxima de 32,0 °C) em Parelhas.

Lajes Pintadas, com 4614 habitantes (IBGE, 2014), situa-se no Agreste Potiguar, distante 136 km da capital Natal, RN. As principais atividades econômicas do município são a agropecuária, o extrativismo e o comércio. Lajes Pintadas possui 1089 domicílios permanentes, sendo 516 na área urbana e 573 na área rural e todos com abastecimento d'água, sendo 402 através da rede geral, 72 através de poço ou nascente e 615 por outras fontes (CPRM, 2005). Apenas 351 domicílios estão ligados à rede de esgotos. O abastecimento de água à população de Lajes Pintadas é realizado através da exploração da Lagoa do Bonfim, distante 102 km, através da Adutora Monsenhor Expedito, pertencente à Bacia Hidrográfica Faixa Litorânea Leste de Escoamento Difuso. Quanto às águas superficiais, o município de Lajes Pintadas encontra-se totalmente inserido nos domínios da bacia hidrográfica do Rio Trairi, sendo banhado pela sub-bacia do Rio Inharé, que o atravessa na direção W-E. Quanto às águas subterrâneas, o município está inserido totalmente no Domínio Hidrogeológico Fissural, composto por rochas do embasamento cristalino que englobam o sub-domínio rochas metamórficas constituído da Formação Seridó e da Suíte Inharé, e o subdomínio de rochas ígneas da Suíte Calcicalalina Itaporanga, Granitóides e do Complexo Santa Cruz (CPRM, 2005).

Parelhas situa-se a 83 km de Lajes Pintadas, sentido Sudoeste, na mesorregião Central Potiguar e na microrregião Seridó Oriental, distante 249 km da capital Natal. Conta com 20.354 habitantes (IBGE, 2010) e 4.864 domicílios permanentes, sendo 3.944 na área urbana e 920 na área rural. Desse total, 3.352 são abastecidos através da rede geral de águas do açude do município, Boqueirão de Parelhas, 582 através de poço ou nascente, e 930 são abastecidos por outras fontes (CPRM, 2005). São 3.206 domicílios ligados à rede geral de esgotos. As principais atividades econômicas do município são a agropecuária, a mineração e o comércio. Quanto às águas superficiais, o município de Parelhas situa-se na Bacia Hidrográfica do rio Piranhas/Açu, que o atravessa no sentido S-NW. Parelhas, assim como Lajes Pintadas, está inserido no Domínio Hidrogeológico Fissural, constituído da Formação Seridó e do Complexo Serra dos Quintos e o subdomínio de rochas ígneas da Suíte Calcicalalina Itaporanga (CPRM, 2005).

Coleta das amostras de água

Foram escolhidas duas fontes de água em cada município, uma proveniente de poço doméstico, e outra de torneira, ambas consumidas pelos moradores locais. As amostras de água foram coletadas tanto na estação chuvosa (fevereiro, 2018), que ocorre entre os meses de janeiro a abril, quanto na estação seca (agosto, 2018), que ocorre nos demais

meses do ano. A coleta de água (**Figura 2**) e seu armazenamento (**Tabela 1**) seguiram as recomendações para cada um dos três testes realizados: ensaio cometa, análise da presença de Radônio, e análise de onze elementos químicos. Todas as análises das amostras de água foram realizadas em triplicatas.

Procedimentos do ensaio cometa

Larvas de *D. melanogaster* da linhagem Oregon-R com 72h de vida foram expostas às amostras de água de poço e da rede de distribuição. As larvas permaneceram por 24 h em tubos contendo meio cultivo à base de purê de batata hidratado com as amostras de água coletadas nos dois períodos do ano. Um grupo controle negativo (exposto à água destilada) e um controle positivo (exposto à ciclofosfamida 1 mg.mL⁻¹) também foram estabelecidos. Após o tempo de exposição, foram extraídas células da hemolinfa (hemócitos) de um grupo de 60 larvas de cada réplica. O material foi submetido à metodologia do ensaio cometa, segundo a descrição de Verçosa et al. (2017). Resumidamente, para a extração da hemolinfa, 60 larvas de cada réplica foram colocadas em uma placa de Petri e resfriadas a 4°C durante 1 min, para diminuir a taxa metabólica e facilitar a manipulação. Em seguida, cada larva foi transferida para um poço de uma placa escavada Kline (de 12 poços), contendo solução de EDTA para impedir a coagulação da hemolinfa. As larvas sofreram um corte longitudinal em sua cutícula com a ajuda de um bisturi e pinça para exposição da hemolinfa. Com uma micropipeta, a hemolinfa depositada na placa Kline, juntamente com a solução de EDTA, foi colhida e transferida para um microtubo de 1,5 mL, que foi centrifugado 2x a 3.000 rpm durante 3 min. Foi descartado 100 µL do sobrenadante e o volume do tubo completado com mais 100 µL de EDTA, e iniciado mais um ciclo de centrifugação, nas mesmas condições.

Para a preparação das lâminas histológicas, estas foram levemente lixadas na face superior para facilitar a adesão da agarose à lâmina. Seguindo a descrição de Verçosa et al. (2017), as lâminas foram lavadas com água e detergente, e secas depois rápida imersão em álcool. Logo após a coleta de 60µL da suspensão da hemolinfa das larvas de *D. melanogaster* o material foi homogeneizado em 100 µL de solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM) a 37°C. Por se tratar de uma etapa fotossensível, esse procedimento foi realizado na ausência de luz. O homogeneizado foi aplicado em lâminas previamente banhadas em agarose padrão e uma lamínula (24 mm x 60 mm) foi colocada sobre o material. Para solidificar a agarose, as lâminas foram mantidas a 4°C durante 10 minutos; posteriormente a este tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram imersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) ajustada para pH 10, e mantidas à 4°C durante 72 h. Ao término do período de lise celular, as lâminas foram mantidas por 20 minutos em uma solução tampão

a 4°C (1 M NaOH; 200 mM EDTA, pH > 13) a fim de desnaturar o material genético. Em seguida, foi realizada a corrida de eletroforese por 20 minutos a 40 V e 300 mA. Passado o tempo da corrida eletroforética as lâminas foram colocadas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min, sendo depois fixadas em etanol absoluto por 5 min, secas ao ar, e armazenadas a 4°C até o momento da análise microscópica. Para observação e análise, as lâminas foram coradas com 50 µL de GelRed™ diluído em água destilada na proporção de 1:500 e observadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2) com filtro AlexaFluor 546 e objetiva de 40x. Foram avaliados em cada tratamento, um total de 100 nucleóides.

Para estimar o potencial efeito genotóxico, os cometas foram quantificados e contabilizados de acordo com o nível de dano genético (de 0 a 4), conforme padrão da **Figura 3**, que se baseia no comprimento da cauda e no tamanho da cabeça do cometa. Zero corresponde à ausência de dano e 4, corresponde ao dano máximo observado. Após a quantificação dos danos, duas medidas foram calculadas: o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%). Os valores obtidos do ID para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacto: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4). O ID foi calculado da seguinte fórmula:

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

O segundo parâmetro, FD% foi calculado como a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 1 a classe 4) em relação ao total de cometas contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total). Ou seja, foi aplicado o seguinte cálculo:

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

Os resultados foram analisados no programa STATA versão 12.0 pelo teste estatístico ANOVA e pós-teste de Bonferroni, para comparar as significâncias estatísticas entre os grupos controle e experimentais, considerando $P < 0.05$.

Cintilação Líquida de Ultra-Baixa Radiação de Fundo

No laboratório, foi previamente preparado o coquetel cintilador, composto por 1,0 L de p-xileno, 7 g de 2,5 difeniloxazol (PPO) e 0,75 g de 1,4 bis [2-(5-difeniloxazol)]-benzeno (POPOP). Também em laboratório, transferiu-se 12,0 mL deste coquetel para recipientes de vidro apropriados para análises por CLUBR (*vials*). Nos locais de estudo, foram separados cerca de 5,0 L de água de cada um dos pontos de coleta em um balde plástico. Alíquotas de 12,0 mL de cada amostra foram injetadas sob o coquetel cintilador nos *vials*, gerando duas

fases distintas (**Figura 2D**). Os recipientes foram fechados, as amostras agitadas durante 5 minutos a fim de extrair o radônio para a fase orgânica e mantidas no escuro por, no mínimo, 30 minutos. As medidas foram realizadas em triplicatas. Branco analítico contendo 12,0 mL água ultrapura Milli-Q® e 12,0 mL do coquetel de cintilação foi levado a campo, seguindo todo o percurso das amostras desde a amostragem até a análise no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste. Para a determinação das concentrações de atividade do radônio nas amostras de água, foi utilizada a técnica de CLUBR desenvolvida por Prichard e Gesell (1977). A análise das amostras foi realizada após um tempo mínimo de 3 horas da realização da coleta, suficiente para que o ^{222}Rn entrasse em equilíbrio com seus radionuclídeos descendentes emissores de partículas alfa (^{214}Po e ^{218}Po). Utilizou-se, para isso, do Contador de Cintilação Líquida (LSC) da Perkin Elmer, modelo Quantulus 1220. O tempo de contagem para cada amostra foi 100 minutos. Para a diferenciação dos espectros provenientes das partículas alfa e das partículas beta foi utilizada a ferramenta de discriminação de pulsos (PSA), cujo valor foi fixado em 90. A qualidade do procedimento analítico da determinação de ^{222}Rn em água também foi avaliada a partir da utilização de padrões internos de ^{226}Ra do PNI – IRD/CNEN independentes daqueles utilizados para o cálculo de eficiência. Foram utilizados cinco padrões com concentrações de atividade de ^{226}Ra diferentes, preparados e analisados de forma análoga à análise de ^{226}Ra das amostras.

As concentrações de atividade de ^{222}Rn (A_{Rn}) nas amostras foram calculadas a partir da Equação a seguir, de acordo com a *American Society for Testing and Materials*- ASTM (1998):

$$A_{\text{Rn}} = \frac{R_A - R_B}{60 \times V \times E \times 3} e^{-\lambda t}$$

Na equação, R_A é a taxa de contagem da amostra (cpm); R_B é a taxa de contagem do branco analítico (cpm); 60 é o fator de conversão de cpm para cps; 3 é o fator de conversão devido aos emissores alfa presentes na amostra (^{222}Rn , ^{218}Po e ^{214}Po); V é o volume da amostra; E é a eficiência de contagem, e o termo $e^{-\lambda t}$ é referente à correção da atividade a partir do tempo. Para isso, λ é a constante de desintegração do ^{222}Rn (min^{-1}) e t é o tempo entre a coleta e metade do tempo de contagem (min).

A determinação da eficiência de contagem E do LSC foi realizada a partir de solução padrão de ^{226}Ra produzida pelo Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD), cuja concentração de atividade de ^{226}Ra de referência foi $11,56 \text{ Bq.L}^{-1}$ (data: 02/10/14). Em recipientes de vidro, foram preparadas três amostras da solução padrão contendo 12,0 mL cada e 12,0 mL do mesmo coquetel cintilador. Foram determinadas as atividades de radônio

nas soluções utilizando procedimento analítico análogo ao das amostras. A eficiência de contagem foi calculada utilizando os resultados obtidos após 21 dias da preparação das soluções padrão, quando o ^{222}Rn da amostra já se encontrava em equilíbrio secular, utilizando a Equação:

$$E = \frac{R_A - R_B}{60 \times V \times A_{Ra} \times 3}$$

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

Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite

A Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) envolve a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos gasosos no estado fundamental. A partir desse fenômeno são determinadas as quantidades dos elementos químicos (metais ou não) em uma ampla variedade de amostras, podendo ser materiais biológicos ou ambientais (água, solo, sedimentos e plantas). GFAAS é utilizada para determinação de baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Krug et al., 2004). Todos os reagentes utilizados foram de grade analítica e a vidraria utilizada foi descontaminada utilizando soluções de Extran 10% e de ácido nítrico destilado 10% seguidas de enxague com água ultra-pura (18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ à 25 °C). Soluções padrões de Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram obtidas utilizando soluções Merck (1.000 mg.L^{-1}) para a obtenção de curvas analíticas. Alíquotas de 20 μL foram injetadas em tubos de grafite e atomizados de acordo com os procedimentos constantes no manual do Espectrômetro de Absorção Atômica 240 AA Zeeman com Forno de Grafite modelo GTA 120. Os comprimentos de onda foram selecionados de acordo com o elemento a ser analisado (Rothery, 1988). Para o controle da qualidade do procedimento analítico, foram analisadas soluções padrões independentes intercaladas com as amostras de água.

Resultados

Ensaio Cometa

Os resultados do ensaio cometa em células somáticas de *D. melanogaster*, expostas às amostras de água de Lajes Pintadas e Parelhas, e resultados obtidos nos grupos controle

negativo e positivo, estão descritos na **Tabela 2**. Também são apresentados os valores absolutos e médios de dano genético (níveis de 0 a 4), do Índice de Dano (ID) e da Frequência de Dano (FD%).

A análise estatística feita pelo pós teste de Bonferroni, com comparações para a par entre os valores médios obtidos em cada tratamento, e os grupos controle, estão apresentados na **Tabela 3**. Conforme o esperado, todas as comparações feitas entre os valores de ID e FD% obtido no grupo controle negativo e controle positivo foram estatisticamente diferentes. O conjunto dos resultados podem ser também observado nos gráficos comparativos da **Figura 4**. Nos tratamentos com água, foram observados valores altos de ID (entre 37,0 e 88,7) em todas as amostras feitas na estação chuvosa, nos dois municípios.

Na estação de estiagem, por outro lado, apenas a água da rede de distribuição de Lajes Pintadas apresentou valores altos de ID (40,67). Quanto à FD%, foram observados resultados também altos (28,0 a 51,0) na estação chuvosa, em todas as amostras de água de Lajes Pintadas e Parelhas (exceto o poço de Parelhas). Na estação de estiagem, apenas a água de torneira de Lajes Pintadas apresentou valores altos de FD% (30,7). Sendo assim, nesta estação houve menos eventos genotóxicos do que na estação chuvosa, de acordo com as análises aqui realizadas em hemócitos de *D. melanogaster*. Ressalta-se o fato de a água de torneira de Lajes Pintadas ter sido sempre indutora de genotoxicidade em todos os testes (**Tabela 2**). Já a água de poço deste município foi significativamente genotóxica apenas na estação chuvosa.

Medidas de Radônio nas amostras de água

As medidas resultantes das análises radiométricas de *Espectrometria de Cintilação Líquida*, e os valores de incerteza, estão apresentadas na **Tabela 4**. A análise dos resultados obtidos indica que houve presença de Radônio em níveis mais elevados apenas nas amostras de água do poço de Parelhas (10.0, 10.6 e 10.5) e do poço de Lajes Pintadas (7.0, 6.5 e 5.1). Nas amostras de água de torneira, foram detectados valores <0,3, que representam valores dentro do limite de detecção. Se comparado aos valores de risco de contaminação por Radônio descritos pela USEPA (1999), que é de 11,1 Bq L⁻¹, nenhuma das amostras de água avaliadas oferece risco para o consumo humano, pois foram inferiores a este valor.

Análise da contaminação por elementos químicos tóxicos

A **Tabela 5** apresenta os resultados da medida de onze elementos químicos tóxicos em amostras de água e suas respectivas réplicas, juntamente com os valores máximos

permitidos para consumo humano (WHO, 2011; CONAMA, 2005). A análise foi realizada em todas as amostras de água, porém apenas na estação de estiagem (agosto, 2018). Foi detectada a presença de alumínio na água de torneira da cidade de Parelhas em concentrações acima do recomendado pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente do Brasil. Todas as demais amostras apresentaram concentrações de elementos químicos determinados dentro dos valores normais recomendados, ou abaixo do limite de detecção do equipamento.

Discussão

Nas amostras de água de poço doméstico analisadas, nas duas estações de coleta, foram obtidos valores de Radônio detectáveis, porém inferiores ao valor de limite determinado pela USEPA (1999) que é de $11,1 \text{ Bq.L}^{-1}$. Quanto à presença e concentração de metais pesados nas fontes hídricas estudadas, foram observados valores superiores ao limite determinado apenas para alumínio, em um dos locais estudados, corroborando resultados prévios de Chaves et al. (2016) para amostras de água feitas diretamente no Boqueirão de Parelhas. O alumínio é um composto neurotóxico que a longo prazo pode causar encefalopatia grave em pacientes que sofrem diálise renal, podendo levar à distúrbios neurológicos (Freitas et al, 2001). Apesar de estar em concentrações controladas na água, levanta um considerável debate no círculo médico relatando o papel deste metal na incidência do mal de Alzheimer (Perl e Good, 1988).

Efeito genotóxico significativo foi observado nos grupos expostos à água coletada na estação chuvosa, a qual não passou pela análise de metais pesados. Inicialmente este estudo se propôs a determinar a presença e efeito genotóxico do ^{222}Rn . Após a primeira análise, realizada em fevereiro de 2018, os resultados indicam baixas quantidade de ^{222}Rn e houve a necessidade de ampliação dos estudos com inclusão de outros compostos químicos que pudessem explicar o efeito genotóxico observado. Esta análise foi providenciada no estudo de agosto de 2018, na estação de estiagem. Mesmo com as análises de onze metais pesados não houve uma relação clara de causa e efeito, pois a maioria das medidas das concentrações dos elementos químicos estiveram dentro dos limites permitidos. Diante dos resultados obtidos, é possível que outros elementos químicos em suspensão ou compostos orgânicos sejam os causadores do efeito genotóxico observado. Nos estudos realizados por Marcon et al. (2017), em um município da mesma região semiárida (Lucrécia, Rio Grande do Norte) não houve relação entre o efeito genotóxico observado nas amostras de águas de açude do local e os valores de metais presentes na água. Os autores sugeriram efeito genotóxico associado à presença de

cianobactérias tóxicas, ou a outros metais pesados não analisados, e até mesmo a outros elementos radioativos presentes na cidade e não investigados.

Os valores de IF e FD% observados nos tratamentos com as amostras de água foram significativamente inferiores aos valores de referência do controle positivo, tratado com ciclofosfamida. Isso poderia ser interpretado como um efeito genotóxico menos intenso das águas analisadas. Medidas de ID e FD% superiores ao controle positivo já foram observados em estudos com *D. melanogaster*, para outros compostos, como extratos de plantas (Érima M. Amorim, comunicação pessoal) e amostras de água de rios de Pernambuco (Marcio Oliveira e Icaro Castro, comunicações pessoais).

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstraram que os grupos de *D. melanogaster* expostos às amostras de água coletadas na estação chuvosa, tanto em poços artesianos quanto em torneiras, nas cidades de Lajes Pintadas e Parelhas, sofreram danos ao seu material genético de uma forma significativamente maior se comparados ao grupo controle negativo (tratado apenas com água destilada). Os resultados indicam que há riscos genotóxicos associados a contaminação das fontes de água estudadas, especialmente na água da rede de abastecimento de Lajes Pintadas. Medidas de Radônio e de onze metais pesados não estiveram claramente associados a este resultado, o que indica a necessidade de mais estudos de outras fontes poluidoras da qualidade da água consumida pela população.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado com recursos da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Agradecimentos especiais aos colegas do Laboratório de Genética CAV/UFPE pela ajuda durante toda a pesquisa.

Referências

Ab'Saber, N. A. Os sertões: a originalidade da terra. **Ciência Hoje**, v. 3, n. 13, p.42-47, 1985.

- Ab'Saber, N. A. Sertões e sertanejos: uma geografia humana sofrida. **Estudos Avançados**, v.13, n. 36, p. 7-59, 1999.
- Alvalá, R.C.S.; Cunha, A.P.M.A.; Brito, S.S.B.; Seluchi, M.E.; Marengo, J.A.; Moraes, O.L.L.; Carvalho, M.A. Drought monitoring in the Brazilian Semiarid region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (in press), 2017.
- Amaral, D.S. **Radônio-222 e radionuclídeos associados em águas de poços e solos em áreas do fosforitouranífero da região metropolitana do Recife**. 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- Campos, T.F.C., Petta, R.A., Malanca, A., Pastura, V.F.S., Sichel, S.E., Motoki, A. Radon gas and natural radiation in metagranitic and pegmatite terrains: the case of the Municipality of Lajes Pintadas (Rio Grande do Norte, Brasil). **Revista de Geologia**, v. 26, n. 2, p. 45–52. 2013.
- Chaves, L.C.C.; Navoni, J.A.; Ferreira, D.M.; Medeiros, S.B.; Costa, T.F.; Petta, R.A.; Amaral, V.S. Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7572-7581, 2016.
- Chowdhury, S.; Mazumder, M. A. J.; Al-Attas, O.; Husain, T. Heavy metals in drinking water: Occurrences, implications, and future needs in developing countries. **Science of the Total Environment**, v. 569-570, p. 476-488, 2016.
- CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 04 jan 2019.
- CPRM - Serviço Geológico do Brasil. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Lajes Pintadas, estado do Rio Grande do Norte**. Mascarenhas, J.C., Beltrão, B.A., Souza Junior, L.C., Pires S.T.M., Rocha D.E.G., Carvalho V.G.D (Org.). Recife: CPRM/PRODEEM, 2005.
- Dantas, R. C.; Navoni, J. A.; Ferreira, D. M.; Costa, T. F.; Medeiros, S. R. B.; Amaral, V.S. Influence of natural radon and metal contamination on surface water quality from a Brazilian semiarid region. **ActaScientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 275-282, 2017.
- Dobrzynski, L.; Fornalski, K. W.; Feinendegen, L. E. Cancer mortality among people living in areas with various levels of natural background radiation. **Dose-Response**, p. 1-10, 2015.
- Freitas, M. B.; Brilhante, O. M.; Almeida, L. M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 651-660, 2001.
- Giampá, C. E. Q.; Gonçalves, V. G. **Águas subterrâneas e poços tubulares profundos**. 2.ed. São Paulo: Oficina de Texto, 2013.

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico de 2010**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rn/parelhas/panorama>>. Acesso em: 07 nov. 2017.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico de 2014**. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 dez. 2014.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico de 2017**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>.
- International Atomic Energy Agency. **World Distribution of Uranium Deposits**. (UDEPO) with Uranium Deposit Classification. AIEA, Vienna. 2009.
- Krug, F.J.; Nóbrega, J.A.; Oliveira, P.V. **Espectrometria de Absorção Atômica Parte 1: Fundamentos e atomização com chama**. 2004
- Marcon, A. E.; Navoni, J. A.; Galvão, M. F. O.; Garcia, A. C. F. S.; Amaral, V. S.; Petta, R. A.; Campos, T. F. C.; Panosso, R.; Quinelato, A. R.; Medeiros, S. R. B. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. **Chemosphere**, v. 167, p. 36-43, 2017.
- Marengo, J. A. Vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima no semiárido do Brasil. **Parcerias Estratégicas**. v. 13, n. 27, p. 149-176, 2008.
- Marengo, J. A.; Alves, L. M.; Alvalá, R. C. S.; Cunha, A. P. M. A.; Brito, S. S. B.; Moraes, O. L. L. Climatic characteristics of the 2010-2016 drought in the semiarid Northeast Brazil region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1973-1985, 2018.
- Moreira, J. C.; Peres, F.; Simões, A. C.; Pignati, W. A.; Dore, E. C.; Vieira, S. N.; Strussmann, C.; Mott, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso, **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1557-1568, 2012.
- Perl, D. P.; Good, P. F. Aluminum, environmental and central nervous system disease. **Environmental Technology Letters**, v. 9, n. 9, p. 901-906, 1988.
- Prichard, H. M.; Gesell, T. F. Rapid measurements of ^{222}Rn in water with a commercial liquids scintillation counter. **Health Physics**, v. 33, p. 557-581, 1977.
- Rocha, C. M. B. M.; Rodrigues, L. S.; Costa, C. C.; Oliveira, P. R.; Silva, I. J.; Jesus, E. F. M.; Rolim, R. G. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 9, p. 1967-1978, 2006.
- Rothery, E. **Analytical methods for graphite tube atomizers**. Varian, Victoria, 1988.
- Silva, R. M.; Silva, J. T.; Nóbrega Junior, O. B. Qualidade da água: o caso de nova descoberta em Natal/RN. **Geoconexões**, v. 2, p. 47-58, 2015.
- Tsutiya, M. T. **Abastecimento de água**. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 3ª edição, 2006. Disponível em: <<https://www.ebah.com.br/content/ABAAAfoOgAH/abastecimento-agua-tsutiya>>. Acesso em: 15 jan 2019.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Office of groundwater and drinking water rule: technical fact sheet EPA 815-F-99-006.** Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, 1999.

Verçosa C.J., Moraes Filho, A.V., Castro, I.F.A., 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, 2017.

Wilson, J.; Young, A.; Civitello, E. R.; Stearns, D. M. Analysis of heat-labile sites generated by reactions of depleted uranium and ascorbate in plasmid DNA. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 45-57, 2014.

WHO World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. Fourth Edition. 2011.

FIGURAS E TABELAS

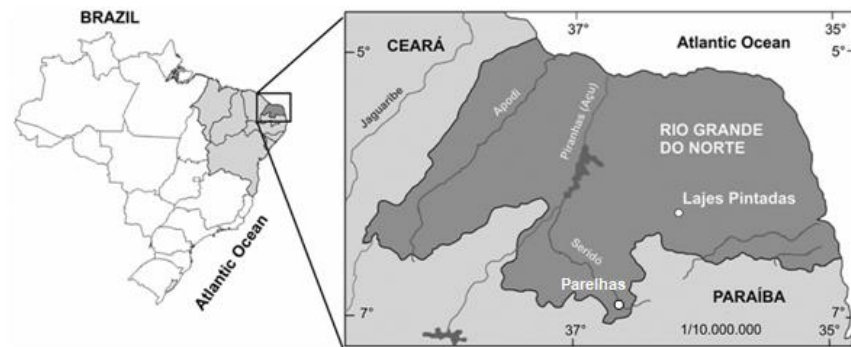


Figura 1. Mapa do Brasil, com destaque para a região semiárida (cinza claro) e estado do Rio Grande do Norte (cinza escuro), com localização dos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas (pontos brancos).

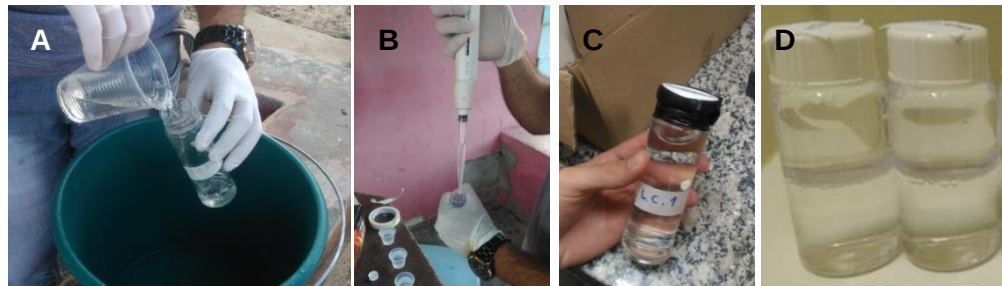


Figura 2. (A) Momento da coleta da amostra de água para realizar o ensaio cometa e a espectrometria de absorção atômica por forno de grafite, para a análise de Radônio; (B) preparação das amostras de água para a análise dos metais pesados por espectrometria de cintilação líquida; (C e D) frascos utilizados para armazenar a água para os dois experimentos.

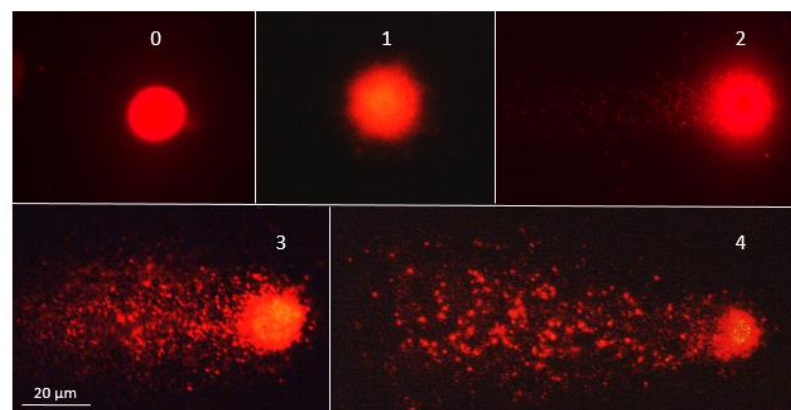


Figura 3. Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético (0 a 4) baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. As imagens foram obtidas de hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster*, coradas por GelRed™ e observadas em microscopia fluorescente. Fonte: Verçosa et al. (2017).

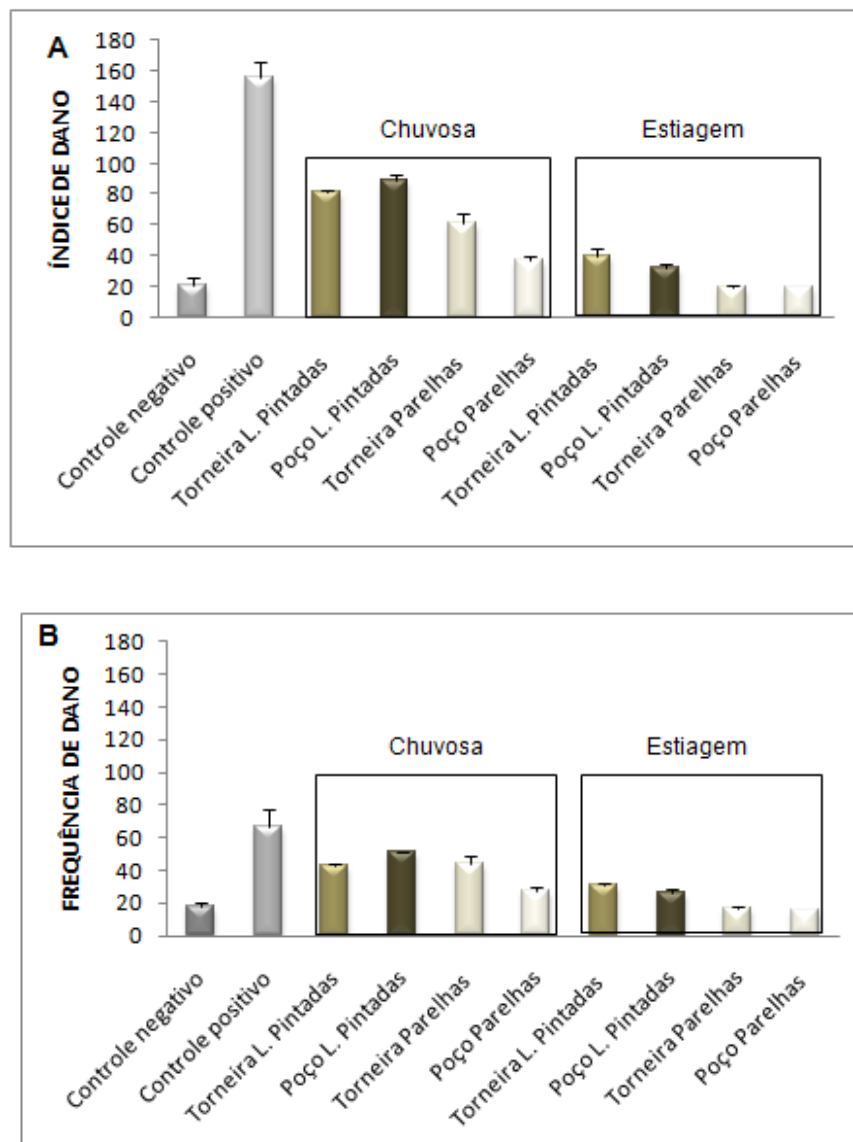


Figura 4. Valores médios de Índice de Dano (A) e Frequência de Dano (B) nos hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) tratados com amostras de água (poço artesiano e torneira) coletadas na estação chuvosa e na estiagem, nos municípios de Lajes Pintadas e Parelhas, Rio Grade do Norte, Brasil; e valores médios obtidos nos grupos controle negativo (tratado com água destilada) e controle positivo (tratado com ciclofosfamida).

Tabela 1. Esquema de coleta e armazenamento das amostras até a realização dos devidos testes.

Teste	Local	Datas das coletas	Número de Pontos	Coordenadas	Armazenagem / Destino	Tempo para análise
Ensaio Cometa	Poço Lajes	20 de fevereiro e 14 de agosto 2018	1	06°09'09.2"S / 036°07'00.5"W	Caixa térmica / Laboratório de Genética CAV/UFPE	<48 h após coleta
	Poço Parelhas		1	06°41'28.7"S / 036°38'26.2"W		
	Torneira Lajes		1	06°08'37.3"S / 036°06'47.3"W		
	Torneira Parelhas		1	06°41'00.0"S / 036°39'52.2"W		
Espectrometria de Cintilação Líquida	Poço Lajes	20 de fevereiro e 14 de agosto 2018	1	-	Caixa de papelão protegida da luz / CRCN	<48 h após coleta
	Poço Parelhas		1	-		
	Torneira Lajes		1	-		
	Torneira Parelhas		1	-		
Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Chama e Grafite	Poço Lajes	14 de agosto de 2018	1	-	Caixa de Papelão / CRCN	Amostras preservadas em ácido e analisadas três meses após coleta
	Poço Parelhas		1	-		
	Torneira Lajes		1	-		
	Torneira Parelhas		1	-		

Tabela 2. Avaliação do dano genético em larvas de *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) submetidas a água destilada (controle negativo), ciclofosfamida (controle positivo) e às águas de torneira e poços de Lajes Pintadas e Parelhas, Rio Grande do Norte, Brasil.

Data da coleta	Tratamentos	Nível de Dano					ID	FD%
		0	1	2	3	4		
Estação chuvosa (fevereiro 2018)	Controle negativo ^a	83	14	3	0	0	20	17
	Controle negativo ^b	85	14	1	0	0	16	15
	Controle negativo ^c	79	15	6	0	0	27	21
	Média	82,33	14,33	3,33	0,00	0,00	21,00	17,67
	SD	3,06	0,58	2,52	0,00	0,00	5,57	3,06
	Controle positivo ^a	34	17	17	23	9	156	66
	Controle positivo ^b	43	15	6	24	12	147	57
	Controle positivo ^c	22	21	32	19	6	166	78
	Média	33,00	17,67	18,33	22,00	9,00	156,33	67,00
	SD	10,54	3,06	13,05	2,65	3,00	9,50	10,54
	Torneira L. Pintadas ^a	56	23	8	11	2	80	44
	Torneira L. Pintadas ^b	58	18	10	11	3	83	42
	Torneira L. Pintadas ^c	56	21	10	11	2	82	44
	Média	56,67	20,67	9,33	11,00	2,33	81,67	43,33
	SD	1,15	2,52	1,15	0,00	0,58	1,53	1,15
	Poço L. Pintadas ^a	49	26	12	9	4	93	51
	Poço L. Pintadas ^b	49	30	9	8	4	88	51
	Poço L. Pintadas ^c	49	30	10	9	2	85	51
Estação de estiagem (agosto 2018)	Média	49,00	28,67	10,33	8,67	3,33	88,67	51,00
	SD	0,00	2,31	1,53	0,58	1,15	4,04	0,00
	Torneira Parelhas ^a	58	30	7	4	1	60	42
	Torneira Parelhas ^b	51	36	7	5	1	69	49
	Torneira Parelhas ^c	58	31	8	3	0	56	42
	Média	55,67	32,33	7,33	4,00	0,67	61,67	44,33
	SD	4,04	3,21	0,58	1,00	0,58	6,66	4,04
	Poço Parelhas ^a	70	21	7	2	0	41	30
	Poço Parelhas ^b	74	20	4	2	0	34	26
	Poço Parelhas ^c	72	23	2	3	0	36	28
	Média	72,00	21,33	4,33	2,33	0,00	37,00	28,00
	SD	2,00	1,53	2,52	0,58	0,00	3,61	2,00
	Torneira L. Pintadas ^a	69	22	8	1	0	41	31
	Torneira L. Pintadas ^b	68	20	11	1	0	45	32
	Torneira L. Pintadas ^c	71	22	7	0	0	36	29
	Média	69,33	21,33	8,67	0,67	0,00	40,67	30,67
	SD	1,53	1,15	2,08	0,58	0,00	4,51	1,53
	Poço L. Pintadas ^a	71	23	6	0	0	35	29
	Poço L. Pintadas ^b	74	20	6	0	0	32	26
	Poço L. Pintadas ^c	75	21	4	0	0	29	25
	Média	73,33	21,33	5,33	0,00	0,00	32,00	26,67
	SD	2,08	1,53	1,15	0,00	0,00	3,00	2,08
	Torneira Parelhas ^a	83	13	4	0	0	21	17
	Torneira Parelhas ^b	85	12	3	0	0	18	15
	Torneira Parelhas ^c	83	13	4	0	0	21	17
	Média	83,67	12,67	3,67	0,00	0,00	20,00	16,33
	SD	1,15	0,58	0,58	0,00	0,00	1,73	1,15
	Poço Parelhas ^a	86	11	3	0	0	17	14
	Poço Parelhas ^b	84	12	4	0	0	20	16
	Poço Parelhas ^c	82	12	6	0	0	24	18
	Média	84,00	11,67	4,33	0,00	0,00	20,33	16,00
	SD	2,00	0,58	1,53	0,00	0,00	3,51	2,00

ID Índice de Dano; FD% Frequência de Dano.

Tabela 3. Análise pós teste de Bonferroni do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) após tratamento de *Drosophila melanogaster* dos grupos controle negativo, controle positivo e expostos às amostras de água coletados em Lajes Pintadas e Parelhas.

	Grupos	Estação chuvosa (fevereiro 2018)						Estação de estiagem (agosto 2018)			
		Controle Negativo	Controle Positivo	Torneira L. Pintadas	Poço L. Pintadas	Torneira Parelhas	Poço Parelhas	Torneira L. Pintadas	Poço L. Pintadas	Torneira Parelhas	Poço Parelhas
Estação chuvosa	Controle Negativo		0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,191	0,028*	0,488	1,000	1,000
	Controle Positivo	0,0001*		0,0001*	0,003*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*
	Torneira L. Pintadas	0,0001*	0,0001*		1,000	1,000	0,005*	0,035*	0,002*	0,0001*	0,0001*
	Poço L. Pintadas	0,0001*	0,0001*	1,000		1,000	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*
	Torneira Parelhas	0,0001*	0,0001*	0,003*	0,0001*		0,002*	0,017*	0,001*	0,0001*	0,0001*
	Poço Parelhas	0,033*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*		1,000	1,000	0,073	0,057
Estação de estiagem	Torneira L. Pintadas	0,004*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,002*	1,000		1,000	0,010*	0,008*
	Poço L. Pintadas	0,570	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	1,000	1,000		0,191	0,151
	Torneira Parelhas	1,000	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,018*	0,002*	0,327		1,000
	Poço Parelhas	1,000	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,022*	0,003*	0,394	1,000	

* Diferenças são significativas (P <0.05).

Tabela 4. Resultados da presença de Radônio, obtidos por espectrometria de cintilação líquida. Todas as amostras de água de torneira apresentaram valores no limite de detecção (<0,3) e não foram incluídos na tabela.

Coleta	Ponto	Réplica	²²² Rn	Incerteza	Coleta	Ponto	Réplica	²²² Rn	Incerteza
Estação chuvosa (fevereiro 2018)	Poço Parelhas	1	10,1	0,7	Estação de estiagem (agosto 2018)	Poço Parelhas	1	7,0	0,7
		2	10,6	0,7			2	6,5	0,6
		3	10,5	0,7			3	5,1	0,6
	Poço L. Pintadas	1	1,2	0,4		Poço L. Pintadas	1	6,0	0,6
		2	1,4	0,4			2	6,6	0,6
		3	-	-			3	6,5	0,6

Tabela 5. Valores (mg.L^{-1}) de metais pesados e respectivos limites máximos permitidos pela WHO (2011) e pelo CONAMA (2005), com destaque (em vermelho) aos valores de alumínio acima dos permitidos. Demais amostras apresentaram concentrações de atividades menores que a atividade mínima detectável.

		Metais pesados (mg.L^{-1})										
		Ag	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
WHO		-	-	0,003	-	0,05	2	0,3	0,4	0,07	0,01	-
CONAMA		0,01	0,1	0,001	0,05	0,05	0,009	0,3	0,1	0,025	0,01	0,18
Pontos	Réplicas											
Torre L. Pintadas	1	0,001	LD	0,0006	0,005	0,004	0,004	LD	0,015	0,010	LD	0,058
	2	0,001	0,02	0,0005	0,001	0,009	0,003	LD	LD	0,007	LD	LD
	3	0,0005	LD	LD	0,004	0,006	0,002	LD	LD	0,004	LD	LD
Poço L. Pintadas	1	0,0003	LD	LD	0,002	0,003	0,003	LD	0,031	0,006	LD	LD
	2	0,0002	0,031	LD	0,003	LD	0,002	LD	0,029	0,003	LD	LD
	3	0,0002	LD	LD	0,004	LD	0,002	LD	0,028	0,005	LD	0,012
Torre L. Parellhas	1	0,0001	0,13	0,0004	LD	LD	0,004	LD	LD	0,003	LD	LD
	2	0,0001	0,17	LD	0,006	LD	0,004	LD	LD	LD	LD	0,009
	3	-	0,25	LD	LD	0,044	0,004	LD	LD	LD	LD	LD
Poço Parellhas	1	0,0004	0,044	LD	LD	0,005	0,002	LD	0,066	LD	LD	LD
	2	0,0003	0,028	0,0006	LD	0,002	0,002	LD	0,061	0,004	LD	LD
	3	0,0004	0,028	LD	0,007	0,001	0,002	LD	0,053	LD	LD	LD

LD – Valores obtidos reportaram Limite de Detecção.

5. ARTIGO 2

A ser submetido à revista:

Environmental Science and Pollution Research

B1 (Biodiversidade), Fator de Impacto: 2,800



Investigação da contaminação por metais pesados e radônio, e avaliação dos níveis de genotoxicidade no açude Boqueirão de Parelhas, semiárido do Brasil

Investigation of contamination by heavy metals and radon and evaluation of genotoxicity levels in the Boqueirão de Parelhas dam, semi-arid region of Brazil

Edson Francisco do Carmo Neto ^{ab}, Samuel Lima de Santana ^b, Érima Maria de Amorim ^b, Déric Soares de Amaral ^c, Alesxandro Francisco do Nascimento ^c, Elvis Joacir De França^c, Rafaela Alves de Oliveira ^a, Claudia Rohde ^{ab}

^a Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico da 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

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

Múltiplos fatores, como a diminuição do suprimento de água, a contaminação, o uso excessivo de águas superficiais e subterrâneas, e longos períodos de baixa precipitação, tem afetado a disponibilidade de água de qualidade, em todo o mundo. Diante deste sério problema ambiental, faz-se necessário a caracterização das diferentes fontes hídricas possivelmente contaminadas. No semiárido do Nordeste brasileiro, recursos hídricos tais como açudes e poços artesianos são afetados pela escassez e pela presença natural de radiação, um fenômeno geológico comum na região, decorrente do afloramento superficial de fontes naturais de Urânio, que compõe a Província Pegmatítica da Borborema. Este estudo investigou a contaminação do açude Boqueirão de Parelhas, principal corpo d'água que abastece o município de Parelhas, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Três pontos do açude (P1, P2, P3), e suas respectivas réplicas, foram analisadas após amostragens feitas na estação chuvosa e de estiagem, em 2018, e analisados por diferentes metodologias. Nas amostras das duas estações do ano, a primeira metodologia caracterizou os níveis de Radônio (^{222}Rn) dissolvido na água, e a segunda, o efeito genotóxico, pelo Ensaio cometa em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Na estação de estiagem, as amostras foram também avaliadas quanto à presença de 11 metais pesados (Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn). Os resultados indicam que existem riscos genotóxicos associados à contaminação das águas do açude, especialmente para as amostras coletadas na estação de estiagem. As concentrações de radônio nas amostras foram insignificantes, em todas as estações. No entanto, concentrações de alumínio ($0,11 \text{ mg.L}^{-1}$) e manganês ($0,13$ a $0,14 \text{ mg.L}^{-1}$) estiveram acima do permitido pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente, no ponto P1 no açude Boqueirão. Os resultados são um alerta para a necessidade de monitorar as variações de contaminantes nas águas do açude Boqueirão de Parelhas, assim como investigar maior número de compostos e seus efeitos ao nível do material genético, em diferentes épocas do ano. Devido aos resultados positivos de genotoxicidade nas duas amostras coletadas na estação de estiagem, e da presença de dois metais pesados acima dos limites seguros, recomenda-se o biomonitoramento deste corpo d'água, e aplicação de mais estudos em outros organismos como modelos.

Palavras chave – *Drosophila melanogaster*, Ensaio cometa, Alumínio, Manganês, Saúde humana.

Introdução

A região semiárida do Brasil é reflexo das condições climáticas dominantes que não sustentam rios capazes de se manterem perenes nos longos períodos de ausência de precipitações (IBGE, 2019). Diante desta realidade, a construção de reservatórios hídricos no semiárido brasileiro, regionalmente chamados de açudes, surgiram entre os primeiros sistemas de engenharia para a mitigação dos efeitos produzidos pelo fenômeno da seca (Pereira Neto, 2017). Tais reservatórios se tornaram a fonte hídrica mais acessada pela população local para o abastecimento humano e animal, nas zonas afetadas pela seca (Rebouças, 1997). O problema ambiental da seca, natural e recorrente, se soma à crescente contaminação decorrente dos processos de urbanização, que lançam esgotos não tratados, insumos da agricultura e outros poluentes nas águas. Por fim, recursos hídricos tais como açudes e poços, são também afetados pela presença de radiação natural, um fenômeno geológico comum na região, decorrente do afloramento superficial de fontes naturais de Urânio, que compõe a Província Pegmatítica da Borborema (International Atomic Energy Agency, 2009).

Diante disso, vários municípios da região semiárida, entre eles Lajes Pintadas, Lucrécia e Parelhas, no Rio Grande do Norte (RN), que apresentam afloramentos rochosos característicos, são abundantes em minerais radioativos, os radionuclídeos (CPRN, 2006), e em metais pesados. Estes são assim caracterizados pela sua massa, número atômico e outras propriedades químicas, podendo ser naturalmente ativos e tóxicos na maioria das células. Nos sistemas biológicos, metais pesados têm a capacidade de interferir nas biomoléculas, na ativação de certos receptores, na regulação de canais iônicos, na sinalização celular e na transcrição de genes, potencializando, desta forma, a toxicidade a nível fisiológico, celular e molecular (Marcon et al., 2010). Estudos realizados nos principais reservatórios da região semiárida do RN revelaram sérios problemas de qualidade de água, incluindo a contaminação por metais pesados e por Radônio (^{222}Rn), detectados em concentrações acima dos limites nacionais estabelecidos. Estes elementos podem contaminar os reservatórios de água e, conseqüentemente, tornarem-se um problema para a saúde humana, conforme os estudos vêm apontando (Marcon et al., 2010; Garcia et al., 2011; Chaves et al, 2016; Dantas et al., 2017).

Portanto, este trabalho investigou o efeito genotóxico das águas do açude de Parelhas, RN, utilizando o organismo-modelo em mutagênese, *Drosophila melanogaster* (Gaivão e Sierra, 2014; Verçosa et al., 2017). A espécie é também amplamente utilizada em estudos de genes e processos biológicos, que são conservados evolutivamente com os seres humanos, e que apresenta facilidade de manipulação laboratorial, rápido ciclo de vida,

facilidade na detecção de fenótipos, grande conhecimento sobre seu genoma, entre outros (Beckingham et al, 2005; Rand, 2010; Rohde, 2012; Lenz et al., 2013). O estudo dos riscos genotóxicos associados ao consumo da água do açude Boqueirão de Parelhas foi acompanhado pela investigação da presença de Radônio (^{222}Rn) e metais pesados nas amostras de água, feitas em duas épocas do ano.

Materiais e métodos

Locais do estudo e coleta das amostras de água

O município de Parelhas, com 20.354 habitantes situa-se na Bacia Hidrográfica do rio Piranhas/Açu, no semiárido brasileiro, e é abastecida pelo açude do Boqueirão de Parelhas (IBGE, 2010) (**Figura 1**). Esse açude é imprescindível para o desenvolvimento econômico e para a sobrevivência da população local e de outros municípios vizinhos. O município está inserido numa zona semiárida do Nordeste do Brasil, onde as temperaturas médias anuais são 27,5 °C (mínimas de 18,0 °C e máximas de 32,0 °C). Amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas foram coletadas em fevereiro/2018 (na estação chuvosa que ocorre entre os meses de janeiro a abril), e em agosto/2018 (na estação de estiagem, que ocorre nos demais meses do ano). Os pontos de coleta foram identificados como P1 (06°41'48.2"S 036°37'39.6"W), P2 (06°41'37.7"S 036°37'43.4"W) e P3 (06°41'25.2"S 036°37'37.3"W). A coleta de água (**Figura 2**) e seu armazenamento seguiram as recomendações para cada um dos três testes realizados (ensaio cometa, a presença de Radônio, e elementos químicos), conforme descrição em Carmo Neto et al. (2019). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Procedimentos do ensaio cometa

Larvas de *D. melanogaster* da linhagem Oregon-R com 72h de vida foram expostas às amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas, ao mesmo tempo que foram preparados os grupos controle negativo (exposta à água destilada) e controle positivo (exposto à ciclofosfamida 1 mg/mL). Posteriormente, o material foi submetido à metodologia do ensaio cometa, segundo a descrição de Carmo Neto et al. (2019) para amostras de água coletadas em campo e administradas às larvas de *Drosophila melanogaster* em até 24h após a coleta. Para observação e análise, as lâminas contendo o material biológico (hemócitos) foram coradas com GelRedTM e observadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2) (Carmo Neto et al., 2019).

Para estimar o potencial efeito genotóxico, os cometas foram quantificados e contabilizados de acordo com o nível de dano genético (de 0 a 4), conforme padrão da

Figura 3, que se baseia no comprimento da cauda e no tamanho da cabeça do cometa (Verçosa et al., 2017). Zero corresponde à ausência de dano e 4, corresponde ao dano máximo observado. Após a quantificação dos danos, duas medidas foram calculadas: o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%). Os valores obtidos do ID para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacto: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) e foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

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

O segundo parâmetro, FD% foi calculado como a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 1 a classe 4) em relação ao total de cometas contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total). Ou seja, foi aplicado o seguinte cálculo:

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

Os resultados foram analisados no programa STATA versão 12.0 pelo teste estatístico ANOVA e pós-teste de Bonferroni, para comparar as significâncias estatísticas entre os grupos controle e experimentais, considerando $P > 0,05$.

Cintilação Líquida de Ultra-Baixa Radiação de Fundo

Os procedimentos de preparação prévia do coquetel cintilador, da coleta e mistura com as amostras de água feitas em Parelhas, e a análise final de ^{222}Rn nas amostras em água em Contador de Cintilação Líquida (LSC) da Perkin Elmer, modelo Quantulus 1220, foram realizadas de acordo com a descrição detalhada apresentada em Carmo Neto et al. (2019). As concentrações de atividade de ^{222}Rn (A_{Rn}) nas amostras foram calculadas a partir da Equação a seguir, de acordo com a *American Society for Testing and Materials* - ASTM (1998):

$$A_{Rn} = \frac{R_A - R_B}{60 \times V \times E \times 3} e^{-\lambda t}$$

Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite

As análises em Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) para a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética; a determinação das quantidades dos elementos químicos (metais ou não); e a GFAAS, utilizada para determinação de baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Krug et al., 2004) foram realizados de acordo com a

descrição detalhada apresentada em Carmo Neto et al. (2019). Soluções padrões de Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram obtidas utilizando soluções Merck (1.000 mg.L^{-1}) para a obtenção de curvas analíticas e os comprimentos de onda foram selecionados de acordo com a quantidade dos analitos (Rothery, 1988). Para o controle da qualidade do procedimento analítico, foram analisadas soluções padrões independentes intercaladas com as amostras de água.

Resultados

Ensaio Cometa

Os resultados do ensaio cometa em células somáticas de *D. melanogaster* expostas às amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas, nas duas estações (chuvosa e estiagem, de 2018), e os tratamentos dos grupos controle negativo e positivo, estão descritos na **Tabela 1**. São apresentados os valores absolutos e médios de dano genético (níveis de 0 a 4), o desvio padrão, o Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%). A análise estatística do pós teste de Bonferroni, com comparações par a par entre os valores médios obtidos em cada tratamento e os grupos controle, estão na **Tabela 2**. Conforme o esperado, os valores mais elevados de ID e FD% foram obtidos no grupo controle positivo. Posteriormente, o valor mais elevado foi o ponto P2, amostrado no período de estiagem (ID=128,3 e FD%= 67,3), seguido do ponto P1 proveniente da mesma amostragem. Houve ainda grande heterogeneidade entre os resultados da estação de estiagem, com valores ID variando de 36,0 (não significativo em relação ao controle negativo) até 128,3 (altamente significativo, $P \leq 0,0001$). É nítido que os valores de ID e FD% foram superiores em indivíduos expostos à água do açude coletada da estação de estiagem, com destaque para P2, em comparação aos valores obtidos na estação chuvosa. Os resultados dos valores médios obtidos estão apresentados no gráfico da **Figura 4**.

Medidas de Radônio nas amostras de água

Neste estudo foram realizadas análises radiométricas também em triplicata para cada um dos pontos nas duas diferentes estações do ano. Contudo, todos os valores obtidos reportaram apenas valores de limite de detecção ($<0,3$) do equipamento utilizado, e estiveram dentro do limite permitido para o consumo de água (USEPA, 1999) que é de $11,1 \text{ Bq.L}^{-1}$.

Análise da contaminação por elementos químicos tóxicos

Na **Tabela 3** estão os resultados da medida de onze elementos químicos tóxicos nas amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas, e os valores máximos permitidos para consumo humano (WHO, 2011; CONAMA, 2005). A análise foi realizada nas amostras de água, da estação de estiagem (agosto, 2018). Conforme indicado na Tabela 3, foi detectada a presença de alumínio (no ponto P1) e de manganês (P1, P2 e P3) em concentrações acima do recomendado pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente do Brasil. As demais amostras apresentaram concentrações de elementos químicos dentro dos valores normais recomendados, ou abaixo do limite de detecção do equipamento.

Discussão

Em estudo realizado com águas do açude Boqueirão de Parelhas coletadas na estação chuvosa e de estiagem de 2014, Chaves et al. (2016) avaliaram o potencial de mutagenicidade (*in vivo*) utilizando o teste de micronúcleo com o peixe *Oreochromis niloticus*. Este teste constatou aumento significativo de anormalidades nucleares nos grupos expostos à água do açude, nas duas estações, quando comparadas ao grupo controle negativo.

Avaliações das concentrações de ^{222}Rn foram realizadas nos diferentes pontos em ambas estações, entretanto, apenas concentrações em níveis insignificantes deste gás foram encontradas. Não foram encontrados trabalhos que avaliaram a concentração de radônio nestas águas, porém outros realizados em cidades vizinhas (Lajes Pintadas, RN) mostram concentrações deste gás que chegam a ser de cinco a sete vezes maiores que o limite determinado pela USEPA (1999) que é de $11,1\text{Bq.L}^{-1}$ (Dantas et al., 2017). Além disso, um estudo de Chaves (2014) acerca da percepção dos moradores da cidade de Parelhas mostrou que 84% dos entrevistados nunca nem se quer ouviu falar sobre o gás Radônio.

Após investigadas a presença de Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn no período de estiagem, os resultados indicaram valores de Alumínio e Manganês superiores ao valor limite delimitado pelo CONAMA no ponto P1, na estação de estiagem (agosto/2018). Em trabalho similar, realizado na estação de estiagem (2013) e na estação chuvosa (2014) Chaves et al. (2016) encontraram concentrações acima do limite não só para Al como também para Co, Pb, Fe e Ni. Marcon et al. (2017) avaliaram as concentrações de metais pesados no açude de Lucrécia/RN e encontraram níveis de Cr, Mn e Ni em concentrações superiores ao limite seguro para consumo, determinados pela WHO e CONAMA, em amostras coletadas entre 2007 e 2009. Por fim, Dantas et al. (2017) encontraram Al, Cd e Ni nas águas do açude Riacho do Cachoeira, em Lajes Pintadas, no ano de 2011.

É sabido que atividades antropogênicas podem causar a liberação de quantidades de substâncias tóxicas em águas superficiais. Embora alguns elementos químicos (como o manganês, cobre, cromo, etc.) sejam essenciais, eles podem também ser tóxicos em excesso. Por outro lado, outros elementos (por exemplo, arsênico, cádmio, chumbo e mercúrio) podem ser tóxicos, mesmo presentes em quantidades muito pequenas (Domingo, 1994). O Alumínio é um componente natural que pode estar presente em águas de superfície e subterrânea, após interação água-rocha e sua consequente lixiviação, por onde a água percola (Freitas et al., 2001). Apesar da concentração de alumínio ser controlada na água distribuída à população, existe um considerável debate no círculo médico relatando o papel neurotóxico deste metal na incidência de encefalopatias graves (Perl e Good, 1988), além de esclerose lateral amiotrófica, demência associada à doença de Parkinson e Alzheimer, e se gravam em pacientes com função renal diminuída (Silva e Moreira, 2009; Tarpani, 2012). O manganês, também detectado em índices elevados no ponto P1 do açude Parelhas, em nosso estudo, é um elemento químico essencial na saúde humana, sendo indispensável para todas as formas de vida, tendo funções tanto estruturais quanto enzimáticas (IMNI, 2005). Porém, em níveis elevados tem potencial neurotóxico, podendo acarretar prejuízos ao Sistema Nervoso Central, tanto em crianças quanto em adultos (Carvalho, 2013; Nascimento e Gonzalez, 2018).

Nas condições experimentais deste trabalho, os resultados indicam que as águas do açude de Parelhas oferecem riscos de dano genético se consumidos por pessoas e animais, a depender da época do ano. Todavia, não foi possível estabelecer as causas destas alterações a partir das abordagens realizadas, e também devido à inerente complexidade da composição da água. É possível que substâncias contaminantes tóxicas diversas, liberadas na água, possam não mostrar efeitos agudos em organismos expostos, mas sim a redução de sobrevivência, aumento de danos teciduais e em células somáticas e germinativas, bioacumulação e geração de neoplasias (Galindo et al., 2012). Os resultados apontam para a necessidade de mais estudos envolvendo não só a caracterização de outros metais pesados e compostos orgânicos, mas também a presença de cianobactérias tóxicas, e outras abordagens no maior número de diferentes organismos.

Conclusão

Os resultados indicam que existe riscos genotóxicos associados à contaminação das águas do açude Boqueirão de Parelhas, especialmente para as amostras coletadas na estação de estiagem. Concentrações significativas de radônio não foram encontradas em nenhuma das estações, porém, níveis de alumínio e manganês estiveram acima dos limites estabelecidos para consumo humano, em algumas amostragens. Recomenda-se a

continuidade das investigações visto que a população do município de Parelhas é abastecida por água tratada, proveniente do próprio açude.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado com recursos da 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) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Agradecimento especial aos colegas do Laboratório de Genética CAV/UFPE e ao Serviço de Análises Ambientais/ CRCN-NE pela ajuda técnica durante toda a pesquisa.

Referências

- Beckingham, K.M.; Armstrong, J.D.; Texada, M.J.; Munjaal, R.; Baker, D.A. *Drosophila melanogaster* - the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular Organisms. **Gravitational and Space Biology**, v. 18, n. 2, p. 17-29, 2005.
- Carmo Neto, E.F.; Santana, S.L.; Amorim, E.M.; Amaral, D.S.; Nascimento, A.F.; França, E.J.; Chagas, C.A.; Rohde, C. Genotoxic effect of well and tap water of municipalities from the semi-arid region of Brazil and its association with radon and toxic chemical elements. **Environmental Science and Pollution Research** (em preparação), 2019.
- Carvalho, C.F. **Efeitos neuropsicológicos da exposição ao manganês em crianças**. Dissertação (Mestrado em Psicologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013. Disponível em: <<http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/14524>>. Acesso em: 18 jan. 2019.
- Chaves, L.C.C. **Influência da radiação ionizante natural no açude do Boqueirão (RN): avaliação de risco saúde/ambiente**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/19858/1/LuizClaudioCardozoChaves_DISSERT.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2019.
- Chaves, L. C.C.; Navoni, J.A.; Ferreira, D.M.; Medeiros, S.B.; Costa, T.F.; Petta, R.A.; Amaral, V.S. Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7572-7581. 2016.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 04 jan 2019.
- CPRN – Serviço Geológico do Brasil. **Mapa Geológico do Estado do Rio Grande do Norte**. 2006.

- Dantas, R.C.; Navoni, J.A.; Ferreira, D.M.; Costa, T.F.; Medeiros, S.R.B.; Amaral, V.S. Influence of natural radon and metal contamination on surface water quality from a Brazilian semiarid region. **ActaScientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 275-282, 2017.
- Dantas, S.R.C.; Alves, N.O.; Ferreira, D.M.; Campos, T.F.C.; Petta, R.A.; Medeiros, G.F.F.; Amaral, V.S. Uso da ecotoxicologia na investigação da toxicidade associada à radiação natural no açude Riacho da Cachoeira, região do Semiárido/Brasil. **Revista de Geologia**, v. 26, n. 2, p. 109-119, 2014.
- Freitas, M.B.; Brilhante, O.M.; Almeida, L.M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 651-660, 2001.
- Gaivão, I.; Sierra, M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 304, p. 1-8, 2014.
- Galindo, T.; Silva, E.; Rosário, I. Indução de micronúcleos e toxicidade por efluente doméstico em duas populações de *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae) no litoral de Salvador (BA), Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2012.
- Garcia, A.C.F.S.; Marcon, A. E.; Ferreira, D. M.; Santos, E. A. B.; Amaral, V. S.; Medeiros, S. R. B. Micronucleus study of the quality and mutagenicity of surface water from a semi-arid region. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 3329-3335, 2011.
- IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. **Censo Demográfico de 2010**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rn/parelhas/panorama>>. Acesso em: 07 nov. 2017.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Semiárido Brasileiro**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias-novoportal/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15974-semiarido-brasileiro.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em: 30 jan. 2019.
- IMnI - International Manganese Institute. **Annual Review** 2005. Disponível em: <<http://www.manganese.org/news-and-publications/annual-reviews/>>. Acesso em: 19 jan. 2019.
- Krug, F.J.; Nóbrega, J.A.; Oliveira, P.V. **Espectrometria de Absorção Atômica** Parte 1: Fundamentos e atomização com chama. 2004.
- Lenz, S.; Karsten, P.; Schulz, J.B.; Voigt, A. *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v.127, p. 453-460, 2013.
- Marcon, A.E.; Ferreira, D. M.; Moura, M. F.; Campos, T. F.; Amaral, V. S.; Agnez-Lima, L. F.; Medeiros, S. R. B. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. **Chemosphere**, v. 81, p. 773-780, 2010.
- Marcon, A.E.; Navoni, J. A.; Galvão, M.F.O.; Garcia, A.C.F.S.; Amaral, V.S.; Petta, R.A.; Campos, T.F.C.; Panosso, R.; Quinelato, A. R.; Medeiros, S. R. B. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. **Chemosphere**, v. 167, p. 36-43, 2017.
- Nascimento, T.F.V.O.; Gonzalez, F. G. Impactos do manganês na saúde pública. **Revinter**, v. 11, n. 3, p. 32-53, 2018.

- Pereira Neto, M.C. Perspectivas da açudagem no semiárido brasileiro e suas implicações na região do Seridó potiguar. **Revista Sociedade & Natureza**, v. 29, n. 2, p. 285-294, 2017.
- Perl, D.P.; Good, P.F. Aluminum, environmental and central nervous system disease. **Environmental Technology Letters**, v. 9, n. 9, p. 901-906, 1988.
- Rand, MD. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 74-83, 2010.
- Rebouças, A. C. Água na região Nordeste: desperdício e escassez. **Estudos Avançados**, V. 11, N. 29, P. 127 - 154, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40141997000100007>>. Acesso em: 24 jan. 2019.
- Rohde, C. Desenvolvimento dos Insetos: *Drosophila*. Capítulo 20. **Embriologia** 3ª edição (Sonia M.L. Garcia & Casimiro G. Fernandes, eds.), ARTMED, Porto Alegre, p. 335-355, 2012.
- Rothery, E. **Analytical methods for graphite tube atomizers**. Varian, Victoria, 1988.
- Silva, A. L. O.; Moreira, J. C. Toxic effects of inorganic contaminants on the health of patients treated with hemodialysis. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 17, n. 3, p.691-730, 2009.
- Tarpani, R. R. Z. **Remoção de alumínio monomérico de água para abastecimento através da ação da carboximetil celulose e da quitina**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/100470>>. Acesso em: 18 jan. 2019.
- USEPA. **Office of groundwater and drinking water rule: technical fact sheet EPA 815-F-99-006**. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, 1999.
- Verçosa C.J., Moraes Filho, A.V., Castro, I.F.A., 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, 2017.
- WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. Fourth edition. 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf;jsessionid=16F178FF205CDA4A44613A9D4ED0E544?sequence=1>. Acesso em: 04 jan 2019.

FIGURAS E TABELAS

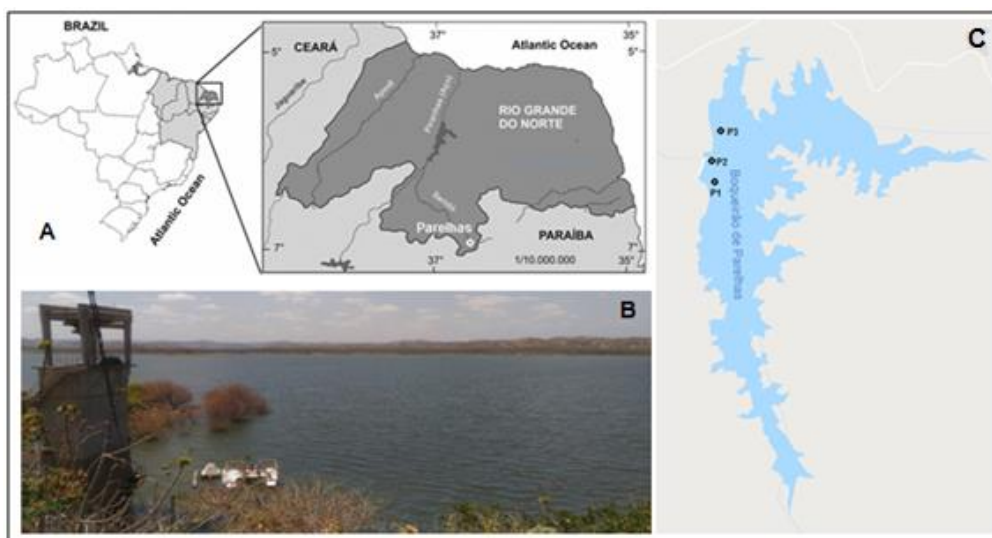


Figura 1. (A) Mapa do Brasil, com destaque para a região Nordeste (cinza claro), o estado do Rio Grande do Norte (cinza escuro) e a cidade de Parelhas (ponto branco); (B) Imagem do açude Boqueirão de Parelhas, durante a coleta realizada em agosto de 2018; (C) posição dos três pontos de coleta no açude (P1, P2 e P3).



Figura 2. (A) Procedimentos de coleta de água no açude Boqueirão de Parelhas, para realizar o ensaio cometa, a espectrometria de cintilação líquida e a absorção atômica em forno de chama e grafite; (B) preparação das amostras de água para a espectrometria de cintilação líquida; (C e D) frascos de vidro utilizados para o armazenamento e transporte das amostras de água.

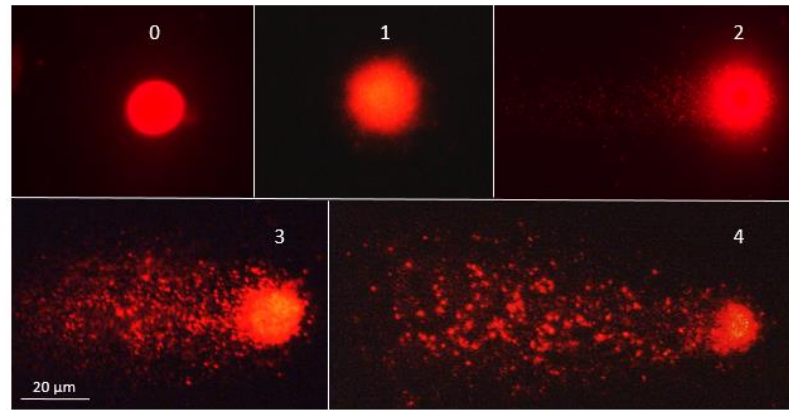


Figura 3. Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético (0 a 4) baseada no comprimento e quantidade de DNA dos cometas. As imagens foram obtidas de hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster*, corados por GelRed™ e observados em microscopia fluorescente, de acordo com Verçosa et al. (2017).

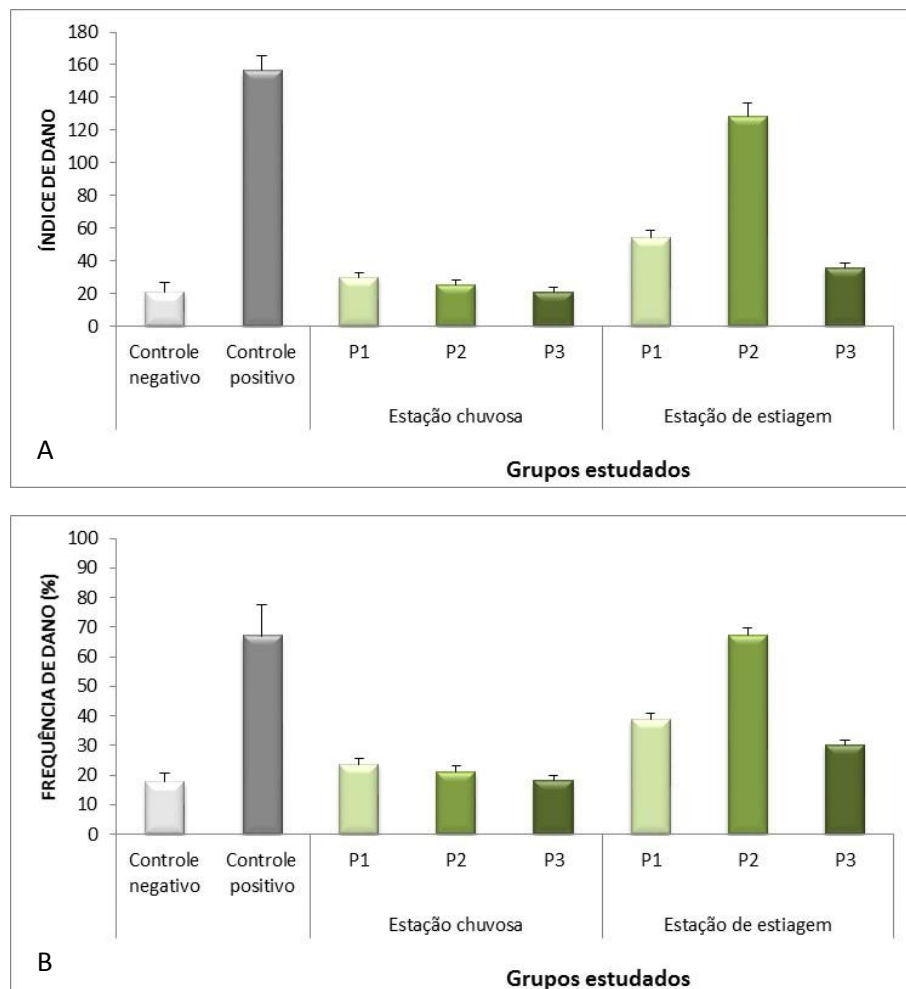


Figura 4. Valores médios de Índice de Dano (A) e Frequência de Dano (B) obtidos no ensaio cometa com *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) submetidos às amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas (pontos P1, P2, P3), na estação chuvosa e na estiagem; e valores médios obtidos nos tratamentos controle negativo e controle positivo. Os valores de desvio padrão estão representados pelas linhas verticais no alto das colunas.

Tabela 1. Avaliação do nível de dano genético em larvas de *Drosophila melanogaster* submetidas ao controle negativo (água destilada), ao controle positivo (ciclofosfamida), a às águas do açude Boqueirão de Parelhas (Pontos 1 a 3), em duas estações do ano. Os valores são apresentados por réplica (a, b, c) e na média de cada tratamento.

Data de coleta	Controles e amostras do açude	Nível de Dano					ID	FD%
		0	1	2	3	4		
	Controle negativo ^a	83	14	3	0	0	20	17
	Controle negativo ^b	85	14	1	0	0	16	15
	Controle negativo ^c	79	15	6	0	0	27	21
	Média	82,33	14,33	3,33	0,00	0,00	21,00	17,67
	SD	3,06	0,58	2,52	0,00	0,00	5,57	3,06
	Controle positivo ^a	34	17	17	23	9	156	66
	Controle positivo ^b	43	15	6	24	12	147	57
	Controle positivo ^c	22	21	32	19	6	166	78
	Média	33,00	17,67	18,33	22,00	9,00	156,33	67,00
	SD	10,54	3,06	13,05	2,65	3,00	9,50	10,54
Estação chuvosa (Fevereiro 2018)	P1 ^a	77	16	7	0	0	30	23
	P1 ^b	74	19	7	0	0	33	26
	P1 ^c	78	17	5	0	0	27	22
	Média	76,33	17,33	6,33	0,00	0,00	30,00	23,67
	SD	2,08	1,53	1,15	0,00	0,00	3,00	2,08
	P2 ^a	79	16	5	0	0	26	21
	P2 ^b	81	15	4	0	0	23	19
	P2 ^c	77	18	5	0	0	28	23
	Média	79,00	16,33	4,67	0,00	0,00	25,67	21,00
	SD	2,00	1,53	0,58	0,00	0,00	2,52	2,00
	P3 ^a	82	17	1	0	0	19	18
	P3 ^b	80	16	4	0	0	24	20
	P3 ^c	83	14	3	0	0	20	17
	Média	81,67	15,67	2,67	0,00	0,00	21,00	18,33
	SD	1,53	1,53	1,53	0,00	0,00	2,65	1,53
Estação de estiagem (Agosto 2018)	P1 ^a	60	24	14	2	0	58	40
	P1 ^b	60	26	13	1	0	55	40
	P1 ^c	63	25	12	0	0	49	37
	Média	61,00	25,00	13,00	1,00	0,00	54,00	39,00
	SD	1,73	1,00	1,00	1,00	0,00	4,58	1,73
	P2 ^a	34	24	22	20	0	128	66
	P2 ^b	30	26	22	21	1	137	70
	P2 ^c	34	28	23	14	1	120	66
	Média	32,67	26,00	22,33	18,33	0,67	128,33	67,33
	SD	2,31	2,00	0,58	3,79	0,58	8,50	2,31
	P3 ^a	68	26	6	0	0	38	32
	P3 ^b	70	23	7	0	0	37	30
	P3 ^c	71	25	4	0	0	33	29
	Média	69,67	24,67	5,67	0,00	0,00	36,00	30,33
	SD	1,53	1,53	1,53	0,00	0,00	2,65	1,53

SD=Desvio Padrão, ID=Índice de Dano, FD%=Frequência de Dano.

Tabela 2. Análise estatística (pós teste de Bonferroni) dos valores médios do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos de *Drosophila melanogaster* controle negativo (água destilada), controle positivo (ciclofosfamida) e amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas (P1 a P3).

Data da coleta	Grupos	Controle negativo	Controle positivo	Estação chuvosa (Fevereiro 2018)			Estação de estiagem (Agosto 2018)		
				P1	P2	P3	P1	P2	P3
Fevereiro 2018	Controle negativo		0,0001*	1,000	1,000	1,000	0,0001*	0,0001*	0,023*
	Controle positivo	0,0001*		0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	1,000	0,0001*
	P1	1,000	0,0001*		1,000	1,000	0,003*	0,0001*	1,000
	P2	1,000	0,0001*	1,000		1,000	0,0001*	0,0001*	0,314
	P3	1,000	0,0001*	1,000	1,000		0,0001*	0,0001*	0,039*
	P1	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*		0,0001*	0,520
Agosto 2018	P2	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*		0,0001*
	P3	0,069	0,0001*	1,000	1,000	0,069	0,011*	0,0001*	

* Diferenças significativas (P < 0.05).

Tabela 3. Valores (mg.L⁻¹) de metais pesados obtidos nas amostras de água nos três pontos do açude de Boqueirão de Parelhas (réplicas a, b, c) em comparação com os limites máximos de cada metal, permitidos pela WHO (2011) e pelo CONAMA (2005). Destaque (em vermelho) aos valores de alumínio e manganês detectados acima do recomendado no ponto P1.

		Metais pesados (mg.L ⁻¹)										
		Ag	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
		WHO	CONAMA									
		-	-	0,003	-	0,05	2	0,3	0,4	0,07	0,01	-
		0,01	0,1	0,001	0,05	0,05	0,009	0,3	0,1	0,025	0,01	0,18
Pontos	Réplicas											
P1	a	LD	0,11	LD	LD	LD	0,0029	0,09	0,14	LD	LD	LD
	b	0,0001	0,09	0,0005	LD	LD	0,0015	0,10	0,13	LD	LD	0,010
	c	LD	0,10	0,0022	LD	LD	0,0011	0,12	0,13	LD	LD	0,028
P2	a	LD	0,028	LD	LD	0,0025	0,0012	0,017	0,09	0,0026	LD	LD
	b	LD	0,021	LD	LD	LD	0,0012	0,015	0,09	LD	LD	LD
	c	LD	0,043	0,0007	LD	LD	0,0009	0,011	0,09	LD	LD	0,010
P3	a	LD	0,08	0,0016	0,0020	LD	0,0010	0,060	0,09	LD	LD	0,017
	b	LD	0,08	LD	LD	LD	0,0010	0,076	0,09	LD	LD	0,012
	c	LD	0,07	LD	LD	LD	0,0008	0,085	0,09	LD	LD	LD

LD – Valores reportaram Limite de Detecção.

6 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho evidenciaram que a metodologia do ensaio cometa aplicada com *Drosophila melanogaster* foi sensível à detecção de danos genéticos provocados pelos efeitos de sua exposição a amostras de água, assim como já havia se mostrado eficiente quanto à poluição atmosférica.

Foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle negativo (água destilada) e os grupos submetidos à exposição de amostras de água coletas na estação chuvosa, tanto em poços artesianos quanto em torneiras, nas cidades de Lajes Pintadas e Parelhas, bem como, para os grupos expostos às amostras de água provenientes da estação de estiagem. Os três grupos (P1, P2 e P3) expostos à água do açude Boqueirão de Parelhas e o grupo submetido à água da torneira da cidade de Lajes Pintadas sofreram danos em seu material genético de uma forma significativamente maior do que o grupo controle negativo.

O presente estudo apresentou também análises quantitativas dos níveis de radônio, as quais revelaram concentrações próximas ao limite para consumo humano ($11,1 \text{ Bq.L}^{-1}$) determinado pela USEPA (1994), apenas nas águas de poços - com concentrações variando de $1,2$ a $10,6 \text{ Bq.L}^{-1}$ - e não nas águas de torneira e/ou açude.

Além disso, realizamos a medida da concentração de 11 metais pesados (Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) em todas as amostras de água de torneira, poços e açude, em ambas cidades da estação de estiagem. A partir destas análises revelamos a presença de alumínio nas amostras de torneira e açude de Parelhas, em concentrações acima do permitido ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$); e concentrações de manganês superiores ao limite ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) em amostras do açude de Parelhas.

De forma geral, os resultados servem de alerta para a necessidade da implementação de medidas mitigadoras voltadas a sensibilização da população para o uso indiscriminado e irrestrito destas fontes de abastecimento, assim como para os órgãos responsáveis pelo tratamento de água, tendo em vista que seu consumo pode causar sérios danos à saúde humana e ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, N. A. Os sertões: a originalidade da terra. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 13, n. 13, p.42-47, 1985.
- AB'SABER, N. A. Sertões e sertanejos: uma geografia humana sofrida. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 13, n. 36, p. 7-59, 1999.
- ADAMS, M.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, London, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.
- AHMAD, J. U.; GONI, M. A. Heavy metal contamination in water, soil, and vegetables of the industrial areas in Dhaka, Bangladesh. **Environmental Monitoring and Assessment**, Boston, v. 166, p. 347-357, 2009.
- ALVALÁ, R. C. S. et al. Drought monitoring in the Brazilian Semiarid region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 91, supl. 1, p. 1-15, 2019.
- AMARAL, D. S. **Radônio-222 e radionuclídeos associados em águas de poços e solos em áreas do fosforito uranífero da região metropolitana do Recife**. 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 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 em Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2016.
- ARAÚJO, J. A.; SOUZA, R. F. Aporte antropogênico de metais pesados em sedimentos de corrente de áreas de lixão, urbanizadas e agrícola, em Parelhas-RN, região semiárida do Brasil. **Geografia**, Londrina, v. 21, n. 3, p. 5-22, 2012.
- ARAÚJO, J. A.; SOUZA, R. F.; SILVA, M. N. Percepção sobre mudanças na paisagem de moradores rurais em área suscetível à desertificação no semiárido potiguar. **Boletim Gaúcho de Geografia**, Porto Alegre, v. 43, n. 2, p. 252-274. 2016.
- AZQUETA, A., COLLINS, A.R. The essential Comet Assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 87, n. 6, p. 949-968, jun. 2013.
- BÄCHLI, G.; BERNHARD, U.; GODKNECHT, A. J. **The database on Taxonomy of Drosophilidae**. Base de Dados, Zurique, 2018. Disponível em: <http://taxodros.uzh.ch/>. Acesso em: 25 jan. 2019.

BAKIR, Y. Y.; BEM, H. Application of pulse decay discrimination liquid scintillation counting for routine monitoring of radioactivity in drinking water in Liquid Scintillation Spectrometry 1994. In: COOK, G.T.; HADKNESS, D.D.; MACKENZIE, A.B.; MILLER, B.F.; SCOTT, E.M. (Eds.), p. 293 –299, **Radiocarbon**, 1996.

BECKINGHAM, K.M. et al. *Drosophila melanogaster* - the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms. **Gravitational and Space Biology**, Alexandria, v. 18, n. 2, p. 17-29, 2005.

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**, Amsterdam, v.415, n. 3, p. 167-184, 1998.

BENFORD D.J. et al. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, London, v. 28, n. 1, p.119-131, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf> Acesso em: 22 dez. 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente .CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 04 jan. 2019.

BRITO, A. S. **Medição de concentrações de radônio em ambientes da região metropolitana de Salvador, BA**. 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde, Ambiente e Trabalho) – Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, 2013. Disponível em: <http://www.sat.ufba.br/site/db/dissertacoes/1872013093511.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2018.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; GOMES, J. A. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzene. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

CAMPOS, T.F.C. et al. Radon gas and natural radiation in metagranitic and pegmatite terrains: the case of the Municipality of Lajes Pintadas (Rio Grande do Norte, Brasil). **Revista de Geologia**, Fortaleza, v. 26, n. 2, p. 45-52, 2013.

CARMO NETO, E. F. et al. Genotoxic effect of well and tap water of municipalities from the semi-arid region of Brazil and its association with radon and toxic chemical elements. **Environmental Science and Pollution Research** (em preparação), 2019.

CARVALHO, C. F. **Efeitos neuropsicológicos da exposição ao manganês em crianças**. 2013. Dissertação (Mestrado em Psicologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013. Disponível em: <http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/14524>. Acesso em: 18 jan. 2019.

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 Biologia Celular e Molecular Aplicada) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2016.

CHAVES, L. C. C. **Influência da radiação ionizante natural no açude do Boqueirão (RN): avaliação de risco saúde/ambiente**. 2014. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/19858/1/LuizClaudioCardozoChaves DISSERT.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2019.

CHAVES, L. C. C. et al. Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 23, n. 8, p. 7572-7581, 2016.

CHOWDHURY, S. et al. Heavy metals in drinking water: Occurrences, implications, and future needs in developing countries. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 569-570, p. 476-488, 2016.

COLLINS, A.R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, Swansea-UK, v. 23, n. 3, p.143–151, 2008.

COLLINS A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 759, p. 27-39, jan-mar. 2014.

MASCARENHAS, J.C.; BELTRÃO, B.A.; SOUZA JUNIOR, L.C., PIRES S.T.M., ROCHA D.E.G., CARVALHO V.G.D (Org.). **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Lajes Pintadas, estado do Rio Grande do Norte**. Recife: CPRM/PRODEEM, 2005.

CPRN- SERVIÇO GEOLÓGICO DO BRASIL. **Mapa Geológico do Estado do Rio Grande do Norte**. Rio Grande do Norte, 2006. 1 mapa.

CRUZ, D. A.B; BELLÓN, M. V. M. *Drosophila melanogaster*: uma espécie idônea para la enseñanza de las ciencias naturales. **Nueva Revista de Ensenanzas Medias**, [s.l.], v. 2, p. 57-64, 1983.

DANTAS, R. C. **Análise da toxicidade no açude Riacho da Cachoeira, Lajes Pintadas (RN): um desafio interdisciplinar**. 2012. Dissertação (Mestrado em Meio

Ambiente, Cultura e Desenvolvimento), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/18223>. Acesso em: 22 ago. 2017.

DANTAS, R. C. *et al.* Uso da Ecotoxicologia na investigação da toxicidade associada à radiação natural no açude riacho da cachoeira, região do semiárido/Brasil. **Revista de Geologia**, Fortaleza, v. 26, n. 2, p. 109-119, 2014.

DANTAS, R. C. *et al.* Influence of natural radon and metal contamination on surface water quality from a Brazilian semiarid region. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 39, n. 3, p. 275-282. 2017.

DAVID, J. R.; CAPY, P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 4, n.4, p. 106-111, 1988.

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

DOBZYNSKI, L.; FORMALSKI, K. W.; FEINENDEGEN, L. E. Cancer mortality among people living in areas with various levels of natural background radiation. **Dose-Response**, Thousand Oaks-CA, v. 13, n. 3, p. 1-10, 2015.

EISENBUD M.; GESELL, T. **Environmental Radioactivity from Natural, Industrial and Military Sources**. 4.ed. California: Academic Press, 1997.

FELIPE, J. L. A.; CARVALHO, E. A.; ROCHA, A. P. B. **Atlas Rio Grande do Norte: espaço geo-histórico e cultural**. João Pessoa: Editra Grafset, 2011.

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

FIGUEIREDO, S. C. S.; SARAIVA JÚNIOR, J. C.; FIGUEIREDO, J. S. Política de combate dos efeitos da Seca no Semiárido Potiguar: o caso de Riacho do Sangue em Macaíba/RN, 2002-2010, **Caderno de Geografia**, Belo Horizonte, v. 26, n. 45, p. 201-223. 2016.

FORTE, M. *et al.* Natural radionuclides measurements in drinking water by liquid scintillation counting. Methods and results. In: WARWICK, P. (Ed.). **Environ. Chem. Anal.**, cidade, v. 2, p.128-142, 2003.

FREITAS, M. B.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 651-660, 2001.

FRESCHI, G. P. G. *et al.* Espectrometria de absorção atômica multielementar simultânea com atomização eletrotérmica em forno de grafite uma revisão da técnica e aplicações. **Eclética Química**, São Paulo ,v. 25, p. 213-226, 2000.

GAIVÃO, I.; SIERRA, M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v.5, n. 304, p.1-8, 2014.

GALINDO, T.; SILVA, E.; ROSÁRIO, I. Indução de micronúcleos e toxicidade por efluente doméstico em duas populações de *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae) no Litoral de Salvador (BA), Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, Itajaí-SC, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2012.

GARCIA, A. C. F. S. *et al.* Micronucleus study of the quality and mutagenicity of surface water from a semi-arid region. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v. 13, p. 3329 – 3335. 2011.

GIAMPÁ, C. E. Q.; GONÇALES, V. G. **Águas subterrâneas e poços tubulares profundos**. 2ed. São Paulo: Oficina de Texto, 2013.

GILBERT, L.I. *Drosophila* is an inclusive model for human diseases, growth and development. **Molecular Cell Endocrinology**, Limerick, v. 293, n. 1-2, p. 25-31, 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**, Amsterdam, v. 757, n.1, p. 60-67, 2013.

GOMES, A.; OSÓRIO, L. S. Utilização da coluna de winogradsky para a demonstração do efeito dos metais pesados na microbiota oxidante de enxofre em ambientes aquáticos: uma abordagem experimental. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda- RJ, v. 16, p. 21-28, 2011.

GRAF, U. The actual situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D. melanogaster*. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, Tlaxcala, v. 10, n. 1, p. 5 -7, 1994.

GUILHERME, I. R. G. *et al.* Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 4, p. 345-390, 2005.

IBGE. **Censo Demográfico de 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rn/parcelhas/panorama>. Acesso em: 07 nov. 2017.

IBGE. **Censo Demográfico de 2014**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/>. Acesso em: 20 dez. 2014.

IBGE. **Censo Demográfico de 2017**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 07 nov. 2017.

IBGE. **Semiárido Brasileiro**. Rio de Janeiro: IBGE, [2017]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias-novoportal/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15974-semiarido-brasileiro.html?=&t=o-que-e>. Acesso em: 30 jan. 2019.

ICRP. **Protection of the public in situation of prolonged radiation exposure**. [S.l.]: Elsevier Science, 1999. Disponível em: http://radon-and-life.narod.ru/pub/ICRP_82.pdf. Acesso em: 28 ago. 2018.

INTERNATIONAL MANGANESE INSTITUTE. **Annual Review 2005**. France, 2005. Disponível em: <http://www.manganese.org/news-and-publications/annual-reviews/>. Acesso em: 19 jan. 2019.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **World Distribution of Uranium Deposits**. (UDEPO) with Uranium Deposit Classification. AIEA, Vienna. 2009.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, Betesda, v. 68, n. 1, p. 167-182, 2003.

KLEINSCHMIDT, R.I. Gross alpha and beta activity analysis in water – a routine laboratory method using liquid scintillation analysis. **Applied Radiation and Isotopes**, [S.l.], v. 61, n. 2-3, p. 333-338, 2004.

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. **Espectrometria de Absorção Atômica Parte 1: Fundamentos e atomização com chama**. São Paulo: CENA-USP; DQ-UFSCar; IQ-USP. 2004. 39 p.

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

LIN, C.F.; WANG, J.J.; HUANG, J.C.; YEH, C.H.; YUAN, M.C.; CHANG, B.J. Evaluating practicability of a LSC method for routine monitoring gross alpha and beta activities in water samples in Taiwan. **Applied Radiation and Isotopes**, Amsterdam, v. 70, n. 9, p. 1981-1984, 2012.

LOPES, I.; MADRUGA, M.J.; CARVALHO, F.P. Application of liquid scintillation counting techniques to gross alpha, gross beta, radon and radium measurement in Portuguese waters. *In: Naturally occurring radioactive materials*, 4., 2005, Szczyrk. **Proceedings [...]** Szczyrk: IAEA, 2005. p. 357-367.

MAFRA, K. C. **Medidas de concentração de radônio-222 em água de poço e solo da região do Pinheirinho em Curitiba e proposta de mitigação da água**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011. Disponível em:

http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/362/1/CT_CPGEI_M_Mafra%2C%20Karina%20Cristina_2011.pdf. Acesso em: 28 ago. 2018.

MARCON, A. E. FERREIRA, D. M.; MOURA, M. F.; CAMPOS, T. F.; AMARAL, V. S.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 81, p. 773-780, 2010.

MARCON, A. E.; NAVONI, J. A.; GALVÃO, M. F. O.; GARCIA, A. C. F. S.; AMARAL, V. S.; PETTA, R. A.; CAMPOS, T. F. C.; PANOSSO, R.; QUINELATO, A. R.; MEDEIROS, S. R. B. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 167, p. 36-43, 2017.

MARENGO, J. A. Vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima no semiárido do Brasil. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, v. 13, n. 27, p. 149-176, 2008.

MARENGO, J. A.; ALVES, L. M.; ALVALÁ, R. C. S.; CUNHA, A. P. M. A.; BRITO, S. S. B.; MORAES, O. L. L. Climatic characteristics of the 2010-2016 drought in the semiarid Northeast Brazil region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 1973-1985, 2018.

MARQUES, A. L.; SANTOS, W.; GERALDO, L. P. Direct measurements of radon activity in water from various natural sources using nuclear track detectors. **Applied Radiation and Isotopes**, Amsterdam, v. 60, n. 6, p. 801-804, 2004.

MEDEIROS, S. S.; CAVALCANTE, A. M. B.; MARIN, A. M. P.; TINÔCO, L. B. M.; SALCEDO, I. H.; PINTO, T. F. **Sinopse do Censo Demográfico para o Semiárido Brasileiro**. Campina Grande: INSA, 2012. 103p. Disponível em: <https://portal.insa.gov.br/acervo-livros/198-sinopse-do-censo-demografico-para-o-semiarido-brasileiro>. Acesso em: 28 dez. 2018.

MILLER, J. R.; HUDSON-EDWARDS, K. A.; LECHLER, P. J.; PRESTON, D.; MACKLIN, M. G. Heavy metal contamination of water, soil and produce within riverine communities of the Rio Pilcomayo basin, Bolivia. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 320, p. 189-209. 2004.

MINGOTE, R. M.; COSTA, H. F. Avaliação do método de espectrometria por cintilação em meio líquido para a medida das atividades alfa e beta total em água: aplicação a águas de abastecimento público no estado de Goiás, Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 569-578, 2016.

MOREIRA, J. C.; PERES, F.; SIMÕES, A. C.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. C.; VIEIRA, S. N.; STRUSSMANN, C.; MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso, **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 1557-1568, 2012.

NASCIMENTO, T.F.V.O.; Gonzalez, F. G. Impactos do manganês na saúde pública. **Revinter**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 32-53, 2018

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**, Hyderabad, v.3, n.3, p. 1-8, 2015.

OLIVEIRA, T. C. **Estabelecimento de Metodologia para Determinação de ^{93}Zr em Rejeitos Radioativos por Espectrometria de Cintilação Líquida (LSC) e Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências e Técnicas Nucleares), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS9JFGMH/tese_final_thiago.pdf?sequence=1. Acesso em: 01 set. 2018.

OSHITA, D.; OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A.; MORAES, M. Determinação Direta e Simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em Cachaça por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. **Eclética Química**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 91-96, 2003.

PEREIRA, R. A. **Diagnóstico dos resíduos sólidos da lavra de rocha ornamental da Pedreira Granorte em Parelhas-RN para aplicação de técnicas de produção mais limpa**. 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Uso Sustentável de Recursos Naturais), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Natal, 2017. Disponível em: <https://memoria.ifrn.edu.br/bitstream/handle/1044/1376/Ranieri%20de%20Ara%C3%BAjo%20Pereira.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 07 nov. 2017.

PEREIRA NETO, M.C. Perspectivas da açudagem no semiárido brasileiro e suas implicações na região do Seridó potiguar. **Revista Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 285-294. 2017.

PERKIN-ELMER. **Recommended Conditions for THGA Furnaces**. Überlingen: 1991. Perkin Elmer Publication N. B3110.06

PERL, D. P.; GOOD, P. F. Aluminum, environmental and central nervous system disease. **Environmental Technology Letters**, Oxfordshire, v. 9, n. 9, p. 901-906, 1988.

PRICHARD, H. M.; GESELL, T. F. Rapid measurements of ^{222}Rn in water with a commercial liquids scintillation counter. **Health Physics**, Philadelphia, v. 33, p. 557-581, 1977.

RAND, M. D. *Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology*. **Neurotoxicology and Teratology**, Amsterdam, v. 32, p. 74-83, 2010.

REBOUÇAS, A. C. Água na região Nordeste: desperdício e escassez. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 11, n. 29, p. 127-154, 1997.

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

REEVE, E. C. *Drosophila melanogaster: The FruitFly*. **Enciclopedia of Genética**. USA: Fitzroy Dearborn Publishers, Amsterdam, v. 6, p. 157, 2001.

ROCHA, C. M. B. M.; RODRIGUES, L. S.; COSTA, C. C.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, I. J.; JESUS, E. F. M.; ROLIM, R. G. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 9, p. 1967-1978, 2006.

ROCHA, C. H. B.; AZEVEDO, L. P. Avaliação da presença de metais pesados nas águas superficiais da Bacia do Córrego São Mateus, Juiz de Fora (MG), Brasil. **Revista Espinhaço/UFVJM**, Diamantina, v. 4, n. 2, p. 33-44, 2017.

ROHDE, C. Desenvolvimento dos Insetos: *Drosophila*.. In: GARCIA, S. M. L.; FERNANDES, C. G. (Org.). **Embriologia**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012. p. 335-355.

ROTHERY, E. **Analytical methods for graphite tube atomizers**. Victoria: Varian Techtron Pty, 1988.

RUBERU, S.R.; LIU, Y.G.; PERERA, S.K. An improved liquid scintillation counting method for the determination of gross alpha activity in groundwater wells. **Health Physics**, Philadelphia, v. 95, n. 4, p. 397-406, 2008.

RUPP, M. T. C. **Utilização de Zeólitas no Tratamento de Efluentes Inorgânicos**. 1996. Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio do Janeiro - COPPE, Rio de Janeiro, 1996.

RUSCONI, R.; AZZELLINO, A.; BELLINZONA, S.; FORTE, M.; GALLINI, R.; SGORBATI, G. Assessment of drinking water radioactivity content by liquid scintillation counting: set up of high sensitivity and emergency procedures. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 379, n. 2, p. 247-253, 2004.

SALONEN, L.; HUKKANEN, H. Advantages of low-background liquid scintillation alphaspectrometry and pulse shape analysis in measuring ²²²Rn, uranium and

226Ra in groundwater samples. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Berlin, v. 226, n. 1-2, p. 67-74, 1997.

SALONEN, L. Alpha/beta liquid scintillation spectrometry in surveying Finnish groundwater samples. **Radiochemistry**, Berlin, v. 48, n. 6, p. 606-612, 2006.

SAMET, J. M. Radiation and cancer risk: a continuing challenge for epidemiologists. **Environmental Health**, Cairo, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2011.

SANTANA, S.L. et al. *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 25, n. 32, p. 32409–32417, 2018.

SANTOS, F. L. O.; GATTI, R. M.; SOUZA, P. R. K. Presença de mercúrio em peixes e sua correlação com a intoxicação alimentar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 9, p. 37- 41. 2006.

SATURNINO, R. S. **Avaliação ds Atividade Mutagênica e Carcinogênica da Anfotericina B em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

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

SILVA, J. D. N. A. AMBIENTE: Uso do ensaio cometa como ferramenta para discussão interdisciplinar de lesão e reparo do DNA na pós-graduação em ensino de ciências. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, 4., 2003, Bauru. **Apresentações [...]** Bauru: ENPEC, 2003. p. 1-13, 2003.

SILVA, J. O Uso do Ensaio Cometa Para o Ensino de Genética Toxicológica. **Genética na Escola**, Ribeirão Preto, v. 2, n. 2, p. 30-33, 2007.

SILVA, A. L. O.; MOREIRA, J. C. Toxic effects of inorganic contaminants on the health of patients treated with hemodialysis. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 691–730, 2009.

SILVA, R. M.; SILVA, J. T.; NÓBREGA JUNIOR, O. B. Qualidade da água: o caso de nova descoberta em Natal/RN. **Geoconexões**, Natal, v. 2, p. 47-58, 2015.

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 em Saúde

Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2016.

TARPANI, R. R. Z. **Remoção de alumínio monomérico de água para abastecimento através da ação da carboximetil celulose e da quitina**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/100470>. Acesso em: 18 jan. 2019.

TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. **Biological Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 87, p. 233–247, 2006.

TSUTIYA, M. T. **Abastecimento de água**. São Paulo: Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2006. Disponível em: <https://www.ebah.com.br/content/ABAAAhLTWAH/abastecimento-agua-tsutiya>. Acesso em: 15 jan. 2019.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P. A.; BETOLETTI. **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 327-346.

USEPA. **Office of groundwater and drinking water rule: technical fact sheet EPA 815-F-99-006**. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, 1999.

VENTUROLI, T. A ciência acertou na mosca. [Editorial]. **Veja online**, v.1895, p. 68, 2005.

VERÇOSA C.J. **Aplicação do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação da genotoxicidade ambiental**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade de Pernambuco, Recife, 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**, Amsterdam, v. 141, p.148-153, 2017.

VOGEL, E.; ZIJLSTRA, J.A.; BLIJLEVEN, W.G.H.; BREIMER, D.D. Metabolic activation and mutagenic properties of procarcinogens in *Drosophila*. In: KOLBER, A.; WONG, T.; GRANT, L. et al. **In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents**. New York: Springer, 1983. p. 215–231.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3 ed. Weinheim : Wiley - VCH, 1999.

WILSON, J.; YOUNG, A.; CIVITELLO, E. R.; STEARNS, D. M. Analysis of heat-labile sites generated by reactions of depleted uranium and ascorbate in plasmid DNA. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, New York, v. 19, p. 45-57, 2014.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. . Genebra, 2011. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf;jsessionid=16F178FF205CDA4A44613A9D4ED0E544?sequence=1 . Acesso em: 04 jan. 2019.

ZAMBONI, M. Epidemiologia do câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 41-47, 2002.

ZIJLSTRA, J. A.; VOGEL, E. W. Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, Netherlands, v. 202, n. 1, p. 251–267, 1988.