



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIAS E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR  
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR  
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E  
NUCLEARES

VINÍCIUS HENRIQUE TEIXEIRA MORAIS

**USO DE *Biomphalaria glabrata* NA MONITORAÇÃO PASSIVA DE ÁGUAS DE  
POÇOS ARTESIANOS COM INFLUÊNCIA DE MATERIAIS RADIOATIVOS  
DE OCORRÊNCIA NATURAL (NORM)**

Recife

2020

VINÍCIUS HENRIQUE TEIXEIRA MORAIS

**USO DE *Biomphalaria glabrata* NA MONITORAÇÃO PASSIVA DE ÁGUAS DE POÇOS ARTESIANOS COM INFLUÊNCIA DE MATERIAIS RADIOATIVOS DE OCORRÊNCIA NATURAL (NORM)**

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

**Área de Concentração:** Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente.

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

**Coorientador:** Prof. Dr. Romilton dos Santos Amaral

Recife

2020

Catálogo na fonte  
Bibliotecário Gabriel Luz, CRB-4 / 2222

M827u

Morais, Vinícius Henrique Teixeira.

Uso de *Biomphalaria glabrata* na monitoração passiva de águas de poços artesianos com influência de materiais radioativos de ocorrência natural (NORM) / Vinícius Henrique Teixeira Moraes – Recife, 2020.

85 f.: figs., quads., tabs., equações, abrev. e siglas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.

Coorientador: Prof. Dr. Romilton dos Santos Amaral.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2020.

Inclui referências.

1. Tecnologias Energéticas e Nucleares. 2. Água subterrânea. 3. NORM. 4. *Biomphalaria glabrata*. 5. Elementos traços. I. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque (Orientadora). II. Amaral, Romilton dos Santos (Coorientador). III. Título.

UFPE

621.4837 CDD (22. ed.)

BCTG / 2020-195

VINÍCIUS HENRIQUE TEIXEIRA MORAIS

**USO DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* NA AVALIAÇÃO EMBRIOTÓXICA,  
CITOTÓXICA E GENOTÓXICA EM ÁGUAS DE POÇOS ARTESIANOS COM  
INFLUÊNCIA DE MATERIAIS RADIOATIVOS DE OCORRÊNCIA NATURAL  
(NORM)**

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

Aprovada em: 18 / 02 / 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hianna Arely Milca Fagundes Silva (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julyanne Torres Bezerra de Mélo (Suplente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Williams Nascimento de Siqueira (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho ao meu amigo fiel e companheiro Sansão! Obrigado por me proporcionar quinze anos incríveis. Espero poder ter a chance de te encontrar algum dia meu amigo de quatro patas (in memoriam).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por tudo que tem feito em minha vida pelas suas realizações e bênçãos.

Agradeço à minha família por ter acreditado em mim e pelo suporte que tem me dado desde os primórdios do meio acadêmico até hoje, sempre me instruindo da melhor forma possível.

Agradeço à minha mãe, Cláudia, uma pessoa que admiro muito e que é muito guerreira pra enfrentar as coisas que a vida traz, sou muito feliz e muito orgulhoso de ser seu filho.

Agradeço a meu pai, Gildo, por ser um bom pai e amigo.

Gostaria de agradecer especialmente a uma mulher que tive a honra de conhecer e que me deu a oportunidade de me abrindo as portas para o mundo científico, minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo, por seus ensinamentos, paciência, atenção, conduta profissional, humildade e um carisma incrível.

Gostaria de agradecer ao meu coorientador Prof. Dr. Romilton dos Santos Amaral pelo acolhimento, paciência, conduta profissional e suporte neste trabalho desenvolvido.

Agradeço aos grandes professores que passaram pela minha vida acadêmica até o atual momento.

Agradeço ao grupo de Radioecologia (RAE) pela recepção, acolhimento e suporte no trabalho desenvolvido.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Radiobiologia pelo companheirismo ao longo dos anos e ajuda profissional.

Agradeço ao Departamento de Energia Nuclear pelo suporte recebido.

Por fim, agradeço ao órgão CAPES pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

As regiões metropolitanas do Recife e Patos, localizadas nos estados de Pernambuco e Paraíba, são conhecidas por possuírem áreas sedimentares que apresentam minerais com concentrações anômalas de Material Radioativo de Ocorrência Natural (NORM). Esta característica pode contribuir para elevação da radiação natural no ar, solo e águas subterrâneas. A composição química de águas subterrâneas resulta, em parte, de reações água-rocha nos respectivos aquíferos, podendo ser encontrado elementos traços como urânio ( $^{238}\text{U}$ ), tório ( $^{232}\text{Th}$ ), radônio ( $^{222}\text{Rn}$ ) e rádio ( $^{226}\text{Ra}$ ). Devido à ineficiência da distribuição de água potável nessas regiões, a utilização da água de poços passou a ser essencial para a população, seja para uso nas residências, agricultura ou até mesmo em pequenos empreendimentos. Portanto, avaliar a radiometria e composição química de águas subterrâneas é um fator importante para a saúde dos indivíduos que habitam essas regiões e utilizam este recurso hídrico. Por isso, o objetivo desta pesquisa foi realizar a radiometria física e biomonitoração com a espécie de molusco *Biomphalaria glabrata* em águas de poços artesianos, utilizadas para consumo, nos municípios de Abreu e Lima em Pernambuco (P1 e P2) e São José do Sabugi na Paraíba (P3). Para a monitoração radiométrica, foram realizadas medidas das concentrações de  $^{222}\text{Rn}$  e  $^{226}\text{Ra}$  por meio da Espectrometria de Cintilação Líquida e caracterização dos elementos químicos  $^{238}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$ , por ICP-MS. Para a biomonitoração, foram empregadas técnicas de ecotoxicidade como citotoxicidade (viabilidade celular e teste do micronúcleo), embriotoxicidade e genotoxicidade (ensaio cometa). Os resultados radiométricos confirmaram níveis elevados de  $^{222}\text{Rn}$  em todas as águas dos poços estudados e alta concentração de urânio natural no poço do Ponto 3, estando os dados acima do limite permitido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e Ministério da Saúde. Os resultados dos bioensaios mostraram que não houve alterações citotóxicas significativas nos moluscos adultos expostos às águas de poços, no entanto, a embriotoxicidade demonstrou que os Pontos 1 e 3 induziram malformações e mortes nos organismos expostos. O ensaio cometa demonstrou que a água causou alterações no DNA, indicando genotoxicidade significativa nos Pontos 1 e 3. Os bioensaios sugerem que a embriotoxicidade e genotoxicidade foram ocasionadas principalmente pela alta concentração do urânio natural, demonstrando assim, a toxicidade das águas de poços estudadas com sensibilidade do bioindicador *B. glabrata* para NORM em água subterrânea.

**Palavras-chave:** Água subterrânea. NORM. *Biomphalaria glabrata*. Elementos traços.

## ABSTRACT

The metropolitan regions of Recife and Patos, located in the states of Pernambuco and Paraíba, are known to have sedimentary areas that present minerals with anomalous concentrations of Naturally Occurring Radioactive Material (NORM). This characteristic can contribute to the elevation of natural radiation in the air, soil and groundwater. The chemical composition of groundwater results, in part, from water-rock reactions in the respective aquifers, with trace elements such as uranium ( $^{238}\text{U}$ ), thorium ( $^{232}\text{Th}$ ), radon ( $^{222}\text{Rn}$ ) and radium ( $^{226}\text{Ra}$ ). Due to the inefficiency of drinking water distribution in these regions, the use of water from wells has become essential for the population, whether for use in homes, agriculture or even in small enterprises. Therefore, assessing the radiometry and chemical composition of groundwater is an important factor for the health of individuals who inhabit these regions and use this water resource. Therefore, the objective of this research was to perform physical radiometry and biomonitoring with the mollusc species *Biomphalaria glabrata* in artesian well waters, used for consumption, in the municipalities of Abreu e Lima in Pernambuco (P1 and P2) and São José do Sabugi in Paraíba (P3). For radiometric monitoring, measurements of the concentrations of  $^{222}\text{Rn}$  and  $^{226}\text{Ra}$  were performed using Liquid Scintillation Spectrometry and characterization of the chemical elements  $^{238}\text{U}$  and  $^{232}\text{Th}$ , by ICP-MS. For biomonitoring, ecotoxicity techniques were used, such as cytotoxicity (cell viability and micronucleus test), embryotoxicity and genotoxicity (comet assay). The radiometric results confirmed high levels of  $^{222}\text{Rn}$  in all waters of the studied wells and a high concentration of natural uranium in the Point 3 well, with the data above the limit allowed by the United States Environmental Protection Agency and the Ministry of Health. Bioassays showed that there were no significant cytotoxic changes in adult mollusks exposed to well water, however, embryotoxicity demonstrated that Points 1 and 3 induced malformations and deaths in exposed organisms. The comet assay demonstrated that water caused changes in DNA, indicating significant genotoxicity at Points 1 and 3. The bioassays suggest that embryotoxicity and genotoxicity were caused mainly by the high concentration of natural uranium, thus demonstrating the toxicity of well water studied with sensitivity of the bioindicator *B. glabrata* to NORM in groundwater.

**Keywords:** Groundwater. NORM. *Biomphalaria glabrata*. trace elements.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dose individual média anual decorrente de fontes naturais.....	18
Figura 2 - Etapas do ICP-MS.....	28
Figura 3 - Interações da radiação ionizante com a matéria.....	30
Figura 4 - O molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	32
Figura 5 - Hemócitos.....	34
Figura 6 - Desova de <i>Biomphalaria glabrata</i> no estágio de blástula.....	35
Figura 7 - Alterações morfológicas embrionárias.....	36
Figura 8 - Localização dos pontos de coleta.....	40
Figura 9 - Recipientes contendo o cintilador e amostras.....	43
Figura 10 - Manutenção dos caramujos <i>B. glabrata</i> .....	48
Figura 11 - Categorias do cometa segundo migração do DNA dos hemócitos de <i>B. glabrata</i> .....	51
Figura 12 - Embriotoxicidade de <i>B. glabrata</i> expostos por 48 h às águas subterrâneas.	58
Figura 13 - Alterações embrionárias encontradas em <i>B. glabrata</i> .....	59
Figura 14 - Viabilidade celular (A) e número de hemócitos totais (B).....	60
Figura 15 - Graus de cometas encontrados.....	63
Figura 16 - Dendrograma sintetizando o agrupamento de dados de acordo com sua semelhança.....	65

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Série de Decaimento Radioativo do $^{238}\text{U}$ .....	19
Quadro 2 - Série de Decaimento Radioativo do $^{235}\text{U}$ .....	20
Quadro 3 - Série de Decaimento Radioativo do $^{232}\text{Th}$ .....	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites para radionuclídeos naturais em água potável.....	23
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos encontrados.....	42
Tabela 3 - Valores obtidos e de referência para o controle de qualidade do procedimento analítico (LSC).....	52
Tabela 4 - Valores obtidos e de referência para o controle de qualidade do procedimento analítico (ICP-MS).....	53
Tabela 5 - Média das concentrações do $^{222}\text{Rn}$ e $^{226}\text{Ra}$ nas águas de poços.....	53
Tabela 6 - Média das concentrações de $^{238}\text{U}$ e $^{232}\text{Th}$ nas águas de poços.....	57
Tabela 7 - Número total de alterações observadas no teste do micronúcleo.....	61
Tabela 8 - Análise do dano genético em hemócitos de <i>B. glabrata</i> expostos às águas de poços	63

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Eficiência de detecção da LSC.....	44
Equação 2 - Atividade de concentração elementar da LSC.....	45
Equação 3 - $E_n$ Number para LSC.....	45
Equação 4 - Teste Z.....	46
Equação 5 - Limite de Detecção de ICP-MS.....	47
Equação 6 - Número total de células viáveis ou inviáveis.....	49
Equação 7 - Porcentagem de células viáveis e inviáveis.....	49
Equação 8 - Índice de Dano .....	50
Equação 9 - Frequência de Dano.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APO	Amebocyte Producing Organ
ASTM	American Society for Testing and Materials
CA	Comet Assay
CLUBR	Cintilação Líquida de Ultrabaixo Nível de Radiação de Fundo
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CRCN-NE	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
DEN/UFPE	Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HCL	Ácido clorídrico
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
ICRP	International Commission on Radiological Protection
IRD	Instituto de Radioproteção e Dosimetria
LD	Limite de Detecção
LSC	Espectrômetro de Cintilação Líquida
MMS	Metil Metano Sulfonato
MN	Teste do micronúcleo
NORM	Material Radioativo de Ocorrência Natural
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PNI	Programa Nacional de Intercomparação
PSA	Pulse Shape Analyzer
RMR	Região Metropolitana do Recife
RMP	Região Metropolitana de Patos
SEAMB	Serviço de Monitoramento Ambiental
UNSCEAR	United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS.....	16
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1	RADIOATIVIDADE NATURAL .....	17
<b>2.1.1</b>	<b>Séries radioativas</b> .....	<b>18</b>
2.2	NORM EM ÁGUA SUBTERRÂNEA.....	22
<b>2.2.1</b>	<b>Radionuclídeos investigados</b> .....	<b>23</b>
2.2.1.1	O Urânio ( $^{238}\text{U}$ ) e o Tório ( $^{232}\text{Th}$ ).....	23
2.2.1.2	O Rádio ( $^{226}\text{Ra}$ ).....	25
2.2.1.3	O Radônio ( $^{222}\text{Rn}$ ).....	26
2.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS.....	27
<b>2.3.1</b>	<b>Espectrometria de cintilação líquida (CLUBR)</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)</b> .....	<b>27</b>
2.4	RADIOECOLOGIA .....	28
2.5	BIOMONITORAÇÃO AMBIENTAL .....	29
<b>2.5.1</b>	<b>O <i>Biomphalaria glabrata</i></b> .....	<b>31</b>
2.6	TÉCNICAS DE ECOTOXICIDADE .....	36
<b>2.6.1</b>	<b>Toxicidade aguda e crônica</b> .....	<b>37</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Viabilidade celular</b> .....	<b>37</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Ensaio do micronúcleo</b> .....	<b>38</b>
2.6.3.1	Binucleação celular.....	38
2.6.3.2	Apoptose.....	39
<b>2.6.4</b>	<b>Ensaio cometa</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>40</b>
3.1	ÁREA DE ESTUDO .....	40
<b>3.1.1</b>	<b>Estado de Pernambuco</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Estado da Paraíba</b> .....	<b>41</b>
3.2	COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS	41
<b>3.2.1</b>	<b>Preparação das amostras para CLUBR</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Preparação das amostras para ICP-MS</b> .....	<b>43</b>

3.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATIVIDADE DO $^{222}\text{Rn}$ E $^{226}\text{Ra}$ POR CLUBR .....	43
<b>3.3.1</b>	<b>Qualidade do procedimento analítico da técnica CLUBR.....</b>	<b>44</b>
3.4	DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR ICP-MS.....	45
<b>3.4.1</b>	<b>Qualidade do procedimento analítico da técnica de ICP-MS .....</b>	<b>46</b>
3.5	CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DO MOLUSCO <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i> ...	47
3.6	EMBRIOTOXICIDADE.....	48
3.7	CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DAS ÁGUAS DE POÇOS.....	48
<b>3.7.1</b>	<b>Viabilidade celular (Azul de Tripán).....</b>	<b>48</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Ensaio do micronúcleo (MN).....</b>	<b>49</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Ensaio cometa em moluscos <i>B. glabrata</i> .....</b>	<b>49</b>
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>4</b>	<b>ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS .....</b>	<b>52</b>
4.1	QUALIDADE DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	52
4.2	ANÁLISE RADIOMÉTRICA DO $^{222}\text{Rn}$ E $^{226}\text{Ra}$ .....	53
4.3	ANÁLISE RADIOMÉTRICA DO $^{238}\text{U}$ E $^{232}\text{Th}$ .....	56
4.4	BIOENSAIOS .....	57
<b>4.4.1</b>	<b>Toxicidade embrionária.....</b>	<b>57</b>
4.4.1.1	Análise da embriotoxicidade em <i>B. glabrata</i> .....	57
<b>4.4.2</b>	<b>Análise da citotoxicidade em hemócitos de <i>B. glabrata</i>.....</b>	<b>59</b>
4.4.2.1	Viabilidade celular.....	60
4.4.2.2	Análise do teste do micronúcleo.....	61
4.4.2.3	Ensaio cometa.....	62
4.5	AGRUPAMENTO DOS DADOS RADIOMÉTRICOS E BIOENSAIOS.....	64
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A radioecologia é uma ciência que estuda o comportamento dos radionuclídeos naturais e artificiais em diferentes ecossistemas, possibilitando avaliar impactos ambientais acarretados pela exploração de recursos naturais como o que ocorre em minas de urânio e carvão mineral, bem como a interação dos radionuclídeos naturais sobre os seres vivos. Dentre os radionuclídeos, urânio e tório merecem destaque devido aos seus decaimentos radioativos originarem elementos como o potássio ( $^{40}\text{K}$ ) de grande importância para o ecossistema e para determinação da dose ambiental e seus impactos biológicos (UNSCEAR, 2008; SALBU, 2009; MAZZILLI et al., 2011).

Estudos realizados sobre os efeitos radiobiológicos e epidemiológicos das radiações ionizantes provenientes de Material Radioativo de Ocorrência Natural (NORM) puderam identificar um expressivo impacto causado na saúde humana, em especial para áreas com altas concentrações de NORM. Por isso, tornou-se uma preocupação para a proteção radiológica a saúde das populações que residem nessas áreas (ALIYU; RAMLI, 2015).

Trabalhos desenvolvidos na Região Metropolitana do Recife (RMR) identificaram a existência de área de ocorrência do fosforito uranífero (NEUMANN et al., 2017; AMARAL et al., 2019). Essa rocha está associada a uma camada geológica datada desde o período cretáceo contendo calcários arenosos depositados com urânio, cujas principais características são distribuição descontínua e espessura variando de centímetros a metros. Afloramentos rochosos têm sido encontrados nos municípios de Igarassu, Abreu e Lima, Paratibe e Olinda, em que estudos radiométricos estão sendo realizados em diferentes compartimentos do ecossistema como solo, ar e água (SOUZA, 2006). Dentre os municípios, destaca-se o bairro do fosfato em Abreu e Lima, que apresentou níveis elevados de radônio em água de poços utilizados, como única fonte de água potável, para consumo residencial (AMARAL et al., 2019).

Outra região que merece destaque quanto à presença de NORM, é o município de São José do Sabugi pertencente ao estado da Paraíba, pois está situado próximo à uma das maiores jazidas de urânio do Brasil localizada no município vizinho de São José de Espinharas (BIZZI, 2003). Este fato despertou o interesse científico nesta região e o grupo de pesquisa de Radioecologia (RAE) do Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE vem estudando este município sendo o trabalho de Silva (2018) um dos mais recentes, onde foi observada a presença de NORM em águas subterrâneas utilizadas para o consumo humano e outros fins.

Os estudos realizados nos municípios de Abreu e Lima e São José do Sabugi mostram a presença de NORM nas regiões despertando assim o interesse científico para novas pesquisas, tais como, elucidar a existência de efeitos nocivos sobre o sistema biológico. Para isto a ecotoxicologia preconiza a utilização de bioindicadores para garantir a monitoração da qualidade ambiental (KENDALL et al., 1996; KNIE & LOPES 2005; CUNHA, 2011). Dentre esses bioindicadores, o molusco *Biomphalaria glabrata* vem sendo utilizado como indicador ambiental tanto para agentes físicos quanto químicos (TALLARICO et al., 2015; SILVA, 2018; LIMA et al., 2019; SIQUEIRA, 2019).

## 1.1 OBJETIVOS

Neste tópico são abordados os objetivos deste trabalho.

### 1.1.1 Objetivo geral

Validar o uso de *Biomphalaria glabrata* como bioindicador em águas de poços influenciadas por NORM dos municípios de Abreu e Lima (PE) e São José do Sabugi (PB).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Quantificar as concentrações do Radônio ( $^{222}\text{Rn}$ ), Rádio ( $^{226}\text{Ra}$ ); Urânio ( $^{238}\text{U}$ ), Tório ( $^{232}\text{Th}$ ) presentes nas águas dos poços artesianos dos municípios de Abreu e Lima e São José do Sabugi por meio de técnicas analíticas;
- b) Analisar a embriotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade das águas dos poços artesianos presentes nos municípios em estudo utilizando moluscos da espécie *B. glabrata*;
- c) Associar à presença dos elementos traços com os efeitos biológicos em moluscos *B. glabrata* expostos às águas sob influência de NORM.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste tópico são abordados assuntos pertinentes para a compreensão deste trabalho.

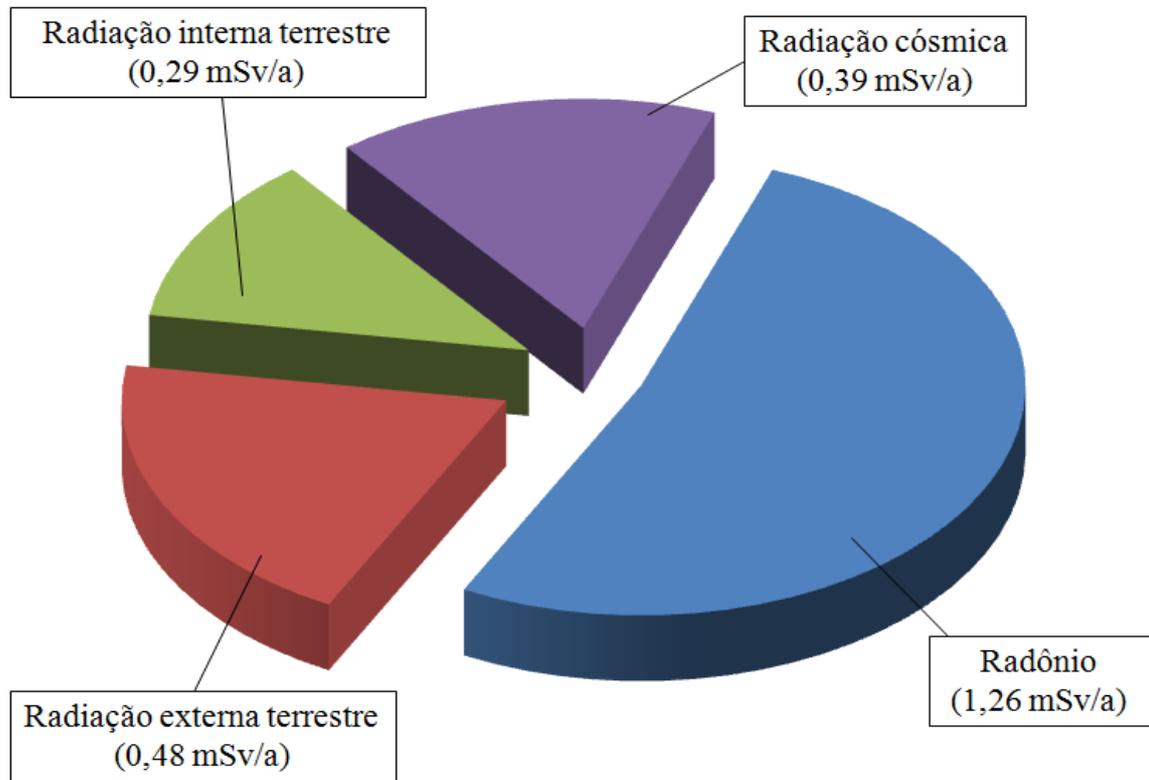
### 2.1 RADIOATIVIDADE NATURAL

Há cerca de 14 bilhões de anos, o universo possuía uma atmosfera e composição propícia ao advento de elementos nuclearmente estáveis e instáveis. A instabilidade nuclear dos mesmos refere-se a um processo espontâneo, denominado decaimento radioativo, que ocorre quando o núcleo de um elemento químico emite radiação ionizante, transformando-se em outro elemento (MURRAY; HOLBERT, 2014; RADVANYI; VILLAIN, 2017). O homem sempre esteve exposto às radiações ionizantes de materiais naturalmente radioativos, também intitulados de Material Radioativo de Ocorrência Natural (NORM) presentes em diferentes compartimentos do ecossistema como solo, ar, a água, raios cósmicos, alimentos e o próprio corpo humano (NADALETI et al., 2016).

Dentre os elementos instáveis, destacam-se o  $^{238}\text{U}$  e o  $^{232}\text{Th}$  ambos possuindo uma meia-vida longa, sendo a meia-vida física do  $^{238}\text{U}$  de 4,5 bilhões de anos e a meia-vida física do  $^{232}\text{Th}$  de 14 bilhões de anos. Estes radionuclídeos são originários da crosta terrestre sendo denominados de terrestres ou primordiais e datam desde o início da formação da Terra. A longa meia-vida faz com que ainda se tenha a presença destes radionuclídeos em abundância na crosta terrestre (SANTOS, 2010; RADVANYI; VILLAIN, 2017).

O  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  e o  $^{232}\text{Th}$  são os precursores das séries de decaimento radioativo em que estes elementos passam por processos de desintegração originando elementos radioativos filhos, contribuindo assim com a dose média anual da radiação natural. Estas séries serão discutidas detalhadamente no próximo tópico (SHAHBAZI-GAHROUEI et al., 2013). Os radionuclídeos primordiais juntamente com o  $^{40}\text{K}$  participam efetivamente na dose proveniente da radiação terrestre por meio da exposição externa (0,48 mSv/a) e interna (0,29 mSv/a) dos indivíduos. O elemento que mais se destaca é o  $^{222}\text{Rn}$  contribuindo com cerca de 52% da dose anual com 1,26 mSv/a. A radiação cósmica ocorre devido à incidência de raios cósmicos que na atmosfera terrestre, originam os radionuclídeos cosmogênicos que, em contato com o indivíduo, contribuem com o aumento da dose média anual de radiação natural (0,39 mSv/a). A altitude é um fator relevante, pois quanto maior a altitude maior a incidência de radiação cósmica, aumentando assim a dose radioativa nos indivíduos (Figura 1) (UNSCEAR, 2008; NADALETI et al., 2016).

Figura 1 - Dose individual média anual decorrente de fontes naturais.



Fonte: UNSCEAR, 2008.

### 2.1.1 Séries radioativas

A série do  $^{238}\text{U}$  é a mais longa possuindo dezessete radionuclídeos, também sendo conhecida como a série  $4n+2$  (Quadro 1). Esta é a série mais importante do ponto de vista da proteção radiológica devido aos radionuclídeos que são produzidos ao longo do decaimento. Dentre eles, existem os mais relevantes para a contribuição de doses anuais como o  $^{226}\text{Ra}$  (rádio). Este é o sexto elemento da série, possuindo meia-vida física de 1.600 anos, emissor alfa e gama, além de ser o precursor do  $^{222}\text{Rn}$  (radônio). O  $^{222}\text{Rn}$  é o mais relevante para a contribuição da dose anual de exposição à fonte natural, sendo caracterizado por ser um gás inerte e emissor alfa com 3,8 dias de meia-vida. O seu decaimento origina quatro radionuclídeos filhos de meia-vidas curtas o  $^{218}\text{Po}$  (polônio),  $^{214}\text{Pb}$  (chumbo),  $^{214}\text{Bi}$  (bismuto) e  $^{214}\text{Po}$  (polônio) (TURNER, 2007; UNSCEAR 2008).

Quadro 1 - Série de Decaimento Radioativo do  $^{238}\text{U}$ .

Nuclídeos	Meia-vida	Maiores energias de radiação (MeV) e intensidades		
		$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
$^{238}\text{U}$	4,468x10 <sup>9</sup> a	4,15 (23%) 4,19 (77%)	-	-
↓				
$^{234}\text{Th}$	24,1 d	-	0,103 (19%) 0,191 (81%)	0,063 (3,5%) 0,093 (4,0%)
↓				
$^{234}\text{Pa}$	1,18 m	-	2,29 (98%)	0,765 (0,30%) 1,001 (0,60%)
99,86% ↓ 0,14%				
$^{234}\text{Pa}$	6,7 h	-	0,53 (66%) 1,13 (13%)	0,10 (50%) 0,70 (24%) 0,90 (70%)
↓				
$^{234}\text{U}$	2,48x10 <sup>5</sup> a	4,72 (28%) 4,77 (72%)	-	0,053 (0,2%)
↓				
$^{230}\text{Th}$	7,52x10 <sup>4</sup> a	4,62 (24%) 4,68 (76%)	-	0,068 (0,6%) 0,142 (0,07%)
↓				
$^{226}\text{Ra}$	1602 a	4,60 (5,5%) 4,78 (94,5%)	-	0,186 (4%)
↓				
$^{222}\text{Rn}$	3,825 d	5,49 (100%)	-	0,510 (0,07%)
↓				
$^{218}\text{Po}$	3,05 m	6,11 (100%)	0,33 (100%)	-
99,98% ↓ 0,02%				
$^{214}\text{Pb}$	26,8 m	-	1,03 (6%)	0,295 (19%) 0,352 (36%)
↓				
$^{218}\text{At}$	2 s	6,65 (6%) 6,70 (94%)	0,67 (94%)	-
↓				
$^{214}\text{Bi}$	19,7 m	5,61 (100%)	3,26 (100%)	0,609 (46%) 1,120 (17%) 1,764 (17%)
99,96% ↓ 0,04%				
$^{214}\text{Po}$	164 $\mu\text{s}$	7,83 (100%)	-	0,799 (0,014%)
↓				
$^{210}\text{Tl}$	1,32 m	-	2,3 (100%)	0,296 (80%) 0,795 (100%) 1,310 (21%)
↓				
$^{210}\text{Pb}$	22 a	3,7 (1,8x10 <sup>-8</sup> %)	0,017 (85%) 0,064 (15%)	0,047 (4%)
↓				
$^{210}\text{Bi}$	5,02 d	4,93 (60%) 4,89 (34%) 4,59 (5%)	1,155 (100%)	-
100% ↓ 1x10 <sup>-5</sup> %				
$^{210}\text{Po}$	138,3 d	5,30 (100%)	-	0,803 (0,0011%)
↓				
$^{206}\text{Tl}$	4,19 m	-	1,520 (100%)	-
↓				
$^{206}\text{Pb}$	ESTÁVEL	-	-	-

Fonte: Silva, 2014.

O precursor da série de decaimento dos actínios é outro isótopo do urânio, o  $^{235}\text{U}$ . Esta série possui 12 radionuclídeos filhos sendo conhecida como a série  $4n + 3$  (Quadro 2). Este urânio possui uma meia-vida física de  $7,1 \times 10^8$  anos, porém a sua abundância assim como a dos seus radionuclídeos filhos é muito baixa, portanto, possui pouca relevância do ponto de vista da proteção radiológica (TURNER, 2007).

Quadro 2 - Série de Decaimento Radioativo do  $^{235}\text{U}$

Nuclídeos	Meia-vida	Maiores energias de radiação (MeV) e intensidades		
		$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
$^{235}\text{U}$	$7,13 \times 10^8$ a	4,36 (18%) 4,39 (57%) 4,1 - 4,6 (8%)	-	0,143 (11%) 0,185 (54%) 0,204 (5%)
↓				
$^{234}\text{Th}$	25,64 h	-	0,300 (~100%)	0,026 (2%) 0,084 (10%)
↓				
$^{231}\text{Pa}$	$3,43 \times 10^4$ a	5,01 (20%) 4,99 (25,4%) 4,94 (22,8%)	-	0,027 (6%) 0,29 (6%)
↓				
$^{227}\text{Ac}$	22 a	4,95 (48,7%) 4,94 (36,1%) 4,87 (6,9%)	0,046 (100%)	0,070 (0,08%)
99,80% ↓				
$^{227}\text{Th}$	18,17 d	5,76 (21%) 5,98 (24%) 6,04 (23%)	-	0,050 (8%) 0,237 (15%) 0,31 (8%)
1,20% ↓				
$^{223}\text{Fr}$	21 m	5,34 (0,005%)	1,15 (100%)	0,050 (40%) 0,080 (135) 0,234 (4%)
↓				
$^{223}\text{Ra}$	11,68 d	5,61 (26%) 5,71 (53,7%) 5,75 (9,1%)	-	0,149 (10%) 0,270 (10%) 0,33 (6%)
↓				
$^{219}\text{Rn}$	3,92 s	6,42 (8%) 6,55 (11%) 6,82 (81%)	-	0,272 (9%) 0,401 (5%)
↓				
$^{215}\text{Po}$	1,83 ms	7,38 (100%)	-	-
↓				
$^{211}\text{Pb}$	36,1 m	-	0,95 (1,4%) 0,53 (5,5%) 1,36 (92,4%)	0,405 (3,4%) 0,427 (1,8%) 0,832 (3,4%)
↓				
$^{211}\text{Bi}$	2,16 m	6,28 (17%) 6,62 (83%)	0,60 (0,28%)	0,351 (14%)
0,32% ↓				
$^{211}\text{Po}$	0,52 s	7,43 (99%)	-	0,570 (0,5%) 0,90 (0,5%)
98,68% ↓				
$^{207}\text{Tl}$	4,79 m	-	1,44 (100%)	0,897 (0,16%)
↓				
$^{207}\text{Pb}$	ESTÁVEL	-	-	-

Fonte: Silva, 2014.

O  $^{232}\text{Th}$  é o precursor de outra série de decaimento radioativo. Esta série possui dez radionuclídeos filhos instáveis, sendo conhecida como a série 4n. Dentre os radioisótopos gerados nesta série, destaca-se o  $^{228}\text{Ra}$ , emissor beta que possui 5,7 anos de meia-vida física. Ele é o precursor do  $^{220}\text{Rn}$ , um radionuclídeo gasoso que possui uma curta meia-vida física de 55,6 segundos não influenciando na vida dos indivíduos, sendo considerado 20 vezes menos relevante que o  $^{222}\text{Rn}$  em contribuição de doses, tendo pouca importância do ponto de vista da proteção radiológica. O Quadro 3 mostra a série de decaimento radioativo do  $^{232}\text{Th}$  (TURNER, 2007).

Quadro 3 - Série de Decaimento Radioativo do  $^{232}\text{Th}$ .

Nuclídeos	Meia-vida	Maiores energias de radiação (MeV) e intensidades		
		$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
$^{232}\text{Th}$	$1,39 \cdot 10^{10}$ a	3,95 (24%) 4,01 (76%)	-	-
↓				
$^{228}\text{Ra}$	5,75 a	-	0,055 (100%)	-
↓				
$^{228}\text{Ac}$	6,13 h	-	2,11 (100%)	0,34 (15%) 0,908 (25%) 0,96 (20%)
↓				
$^{228}\text{Th}$	1,913 a	5,34 (28%) 5,42 (71%)	-	0,084 (1,6%) 0,214 (0,3%)
↓				
$^{224}\text{Ra}$	3,64 d	5,45 (5,5%) 5,68 (94,5%)	-	0,241 (3,7%)
↓				
$^{220}\text{Rn}$	55,6 s	6,30 (~100%)	-	0,55 (0,07%)
↓				
$^{216}\text{Po}$	0,145 s	6,78 (100%)	-	
↓				
$^{212}\text{Pb}$	10,64 h	-	0,58 (100%)	0,239 (47%) 0,300 (3,2%)
↓				
$^{212}\text{Bi}$	60,5 m	6,05 (70%) 6,09 (30%)	2,25 (100%)	0,040 (2%) 0,727 (7%) 1,620 (1,8%)
64% ↓				
$^{212}\text{Po}$	304 ns	8,78 (100%)	-	
36% ↓				
$^{208}\text{Tl}$	3,1 m	-	1,80 (100%)	0,511 (23%) 0,583 (86%) 0,860 (12%) 2,614 (100%)
↓				
$^{208}\text{Pb}$	ESTÁVEL	-	-	-

Fonte: Silva, 2014.

Como visto anteriormente, estes elementos das séries radioativas estão presentes nas águas subterrâneas, por isso é de extrema relevância o estudo e o entendimento desses compostos nesta matriz (SILVA; BONOTTO, 2016).

## 2.2 NORM EM ÁGUA SUBTERRÂNEA

As águas subterrâneas têm sido uma fonte ativa na pesquisa científica devido sua importância, tanto como recurso da sociedade quanto como componente do ciclo hidrológico global (PORCELLI; SWARZENSKI, 2003). A sua utilização pela sociedade visa atender necessidades pessoais, econômicas e sociais. No entanto, seu uso de forma inadequada pode acarretar risco à saúde, pois pode conter, por exemplo, alta concentração de elementos radioativos naturais. As águas subterrâneas recebem esses elementos através da sua movimentação em fraturas de rochas que contém NORM, podendo assim, adquirir radioatividade suficiente para afetar a saúde humana (BRANCO, 1991; SKEPPSTRÖM; OLOFSSON, 2007; CANU et al., 2011).

Os radionuclídeos naturais quando presentes nas águas subterrâneas apresentam predominante o  $^{238}\text{U}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{222}\text{Rn}$  (KHAYET; MATSUURA, 2013; ERÖSS et al., 2018). Ao ingerir a água subterrânea contendo radionuclídeos, estes são absorvidos na corrente sanguínea e se acumulam em tecidos e órgãos, como ossos e rins, podendo causar toxicidade radioativa e química. Os radionuclídeos mesmo em baixas concentrações têm a capacidade de produzir um efeito biológico prejudicial (AL-AMIR et al., 2012; EL-MAGEED et al., 2013; DARKO et al., 2015).

Portanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu limites de radioatividade em água potável, seja para a radiação de origem natural ou antrópica. Os limites são de  $0,5 \text{ Bq.L}^{-1}$  para emissão alfa e  $1 \text{ Bq.L}^{-1}$  para emissão beta. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) estabeleceu a normatização da qualidade da água para o consumo humano, anunciada pela Portaria Nº 2.914, que estabelece procedimentos de controle e vigilância assim como o padrão de potabilidade. Esta normatização tem como base de referência para radionuclídeos em água potável os limites preconizados pela OMS. O anexo IX da Portaria Nº 2.914 e a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) relatam que caso os valores encontrados em amostras sejam superiores aos limites recomendados, será necessária a investigação dos radionuclídeos e suas concentrações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; WHO, 2011).

Segundo as Diretrizes Básicas de Radioproteção da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN-NE 3.01), os radionuclídeos encontrados em amostras de águas subterrâneas devem ser submetidos aos limites preconizados por esta norma para a aprovação de sua qualidade (AMARAL, 2004). Estes limites se baseiam na recomendação da *International Commission on Radiological Protection* (ICRP) para radioatividade em água e alimentos. A OMS também segue os mesmos limites (Tabela 1) (USEPA, 1999; WHO, 2011; CNEN, 2014).

Tabela 1 - Limites para radionuclídeos naturais em água potável.

<b>Radionuclídeo</b>	<b>Concentração Máxima Permitida</b>	<b>Referências</b>
$^{222}\text{Rn}$	11,1 Bq.L <sup>-1</sup>	USEPA,1999
$^{226}\text{Ra}$	1 Bq.L <sup>-1</sup>	WHO, 2011
$^{232}\text{Th}$	1 Bq.L <sup>-1</sup>	WHO, 2011
$^{238}\text{U}$	30 µg.L <sup>-1</sup>	WHO, 2011

Fonte: O autor, 2020.

### 2.2.1 Radionuclídeos investigados

Neste tópico são abordados os radionuclídeos investigados neste estudo.

#### 2.2.1.1 O Urânio ( $^{238}\text{U}$ ) e o Tório ( $^{232}\text{Th}$ )

Os radionuclídeos das séries de decaimento do  $^{238}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$  são ferramentas importantes na investigação de aspectos químicos e do comportamento dos aquíferos. A interação dos radionuclídeos com a água subterrânea ocorre por meio do processo  $\alpha$ -recuo. Neste processo, os radionuclídeos de ambas as séries estão em equilíbrio secular, isto é, suas atividades são iguais. A cada decaimento alfa é gerado uma energia suficiente para que o radionuclídeo filho percorra cerca de 20 nm em uma direção aleatória dentro do mineral portador do  $^{238}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$ . Ao ultrapassar a interface água-mineral, o radionuclídeo filho interage com a água subterrânea, sendo este um processo físico, não sendo afetado pelas

propriedades químicas da água subterrânea (KIGOSHI, 1971; FLEISCHER; RAABE, 1978; PORCELLI, 2008).

O urânio possui três isótopos, o  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  e  $^{234}\text{U}$ , que possuem meia-vida física de  $4,5 \times 10^9$ ,  $7,1 \times 10^8$  e  $2,5 \times 10^5$  anos, respectivamente. A porcentagem de massa do urânio natural na crosta terrestre do  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  e  $^{234}\text{U}$  equivale a 99,27, 0,72 e 0,005%, respectivamente (TRIPATHI et al., 2013). Sua principal ocorrência mineral é a uraninita conhecida também por pechblenda, sendo encontrada mais comumente em águas naturais na forma de  $\text{U}^{4+}$  e  $\text{UO}_2^{2+}$ . Sob condições de oxidação, o urânio é altamente móvel na água ficando no estado hexavalente formando complexos solúveis com carbonato e fosfato em pH neutro e com sulfato e fluoreto em pH ácido. Sob condições redutoras, o urânio fica no estado tetravalente na forma estável de  $\text{U}(\text{OH})_4$ . O urânio emite partículas  $\alpha$ , sendo capaz de produzir partículas  $\beta$  e raios gama. Além de ser radioativo, ele também é quimicamente tóxico sendo transferido ao organismo por inalação, contato com a pele, água e alimentos. Quando ingerido, ele gera compostos oxidantes afetando células ósseas e renais. A concentração média de urânio na água potável é de 3  $\mu\text{g/L}$ . A Portaria Nº 2.914 do Ministério da Saúde recomenda que o limite de potabilidade do urânio seja de 30  $\mu\text{g/L}$  (PORCELLI, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; NRIAGU et al., 2012; WU et al., 2014; ASIC et al., 2017; GOUGET, 2019).

O tório apresenta seis isótopos radioativos naturais ( $^{227}\text{Th}$ ,  $^{228}\text{Th}$ ,  $^{230}\text{Th}$ ,  $^{231}\text{Th}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{234}\text{Th}$ ), sendo o  $^{232}\text{Th}$  o único terrestre. Este é um emissor  $\alpha$ -(90%),  $\beta$ -(1%), e  $\gamma$ -(9%). Possui abundância média na crosta terrestre de 8,1 mg/Kg. Em águas subterrâneas pode ser encontrado até  $< 0,1 \text{ mg/L}$ . Esta baixa concentração pode ser explicada pelo fato do tório só ser retirado dos minerais aquíferos por intemperismo, tendo também alta absorção pelos minerais e baixa solubilidade. Os principais minerais são torita, torianita e a monazita, sendo este último mineral o que mais se destaca, pois, pode comportar o tório em até 33% de sua composição. O estado de oxidação mais estável do tório, em meio aquoso, é o  $\text{Th}^{4+}$ . Ainda não se tem regulamentado o limite máximo para o tório em água. O  $^{232}\text{Th}$  pode ser transferido ao organismo por inalação, contato com a pele e ingestão. Quanto à toxicidade, ele libera radioatividade no organismo além de causar estresse oxidativo, depositando-se preferencialmente no fígado e nos ossos, sendo capaz de atingir o cérebro causando problemas neurológicos (EISENBUD; GESELL, 1997; PORCELLI, 2008; KUMAR et al., 2009; KUMAR et al., 2013; PHILLIPS; WATSON, 2015; MA et al., 2016).

### 2.2.1.2 O Rádio ( $^{226}\text{Ra}$ )

O rádio é um metal alcalino-terroso que representa um dos elementos do grupo IIA da tabela periódica, possuindo o número atômico 88. Este elemento possui mais de 20 isótopos radioativos, dentre eles, somente o  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{228}\text{Ra}$  são originados das séries de decaimento radioativo natural. Os isótopos  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{228}\text{Ra}$  apresentam uma meia-vida física maior do que os demais isótopos sendo de 1.622 anos e 5,8 anos, emissor  $\alpha$  e  $\beta^-$ , respectivamente. Eles são os mais importantes do ponto de vista radioecológico, pois apresentam uma alta toxicidade, facilidade de incorporação, elevada meia-vida física e abundância natural na crosta terrestre quando comparado aos outros isótopos (BAIRD, 2002; JIA; JIA, 2012; MEDLEY et al., 2015)

A principal fonte de rádio está na crosta terrestre, sendo sua concentração na ordem de  $10^{-6}$ . Sua transferência é realizada por meio de processos naturais e antropogênicos sendo encontrado na água, no solo e no ar (BOWEN, 1979). Determinar a sua presença em amostras ambientais é de extrema importância, pois o rádio afeta o meio ambiente, estando presente em resíduo ou subproduto industrial presente na mineração, extração de petróleo, fosfato e combustão de carvão. Além disso, este elemento químico pode afetar a saúde dos seres vivos, pois é facilmente incorporado em ossos de mamíferos, devido a sua similaridade química e biológica aos outros metais alcalino-terrosos como o bário e cálcio. O consumo de comida e água que possuam uma alta concentração de rádio pode levar ao acúmulo deste elemento nos ossos em um percentual de aproximadamente 70 a 80% dos casos e o restante pode ser acumulado no tecido muscular. No osso, pode ocorrer a produção de osteosarcoma pela radioatividade do  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{228}\text{Ra}$ , sendo o carcinoma de crânio exclusivo do  $^{226}\text{Ra}$  (HETMAN et al., 1998; AMARAL, 2004; JIA et al., 2007; JIA; JIA, 2012).

Em relação a sua solubilidade em água, o rádio quando em solução pouco salina é encontrado na forma  $\text{Ra}^{2+}$  sem estar complexado com outro elemento, porém em solução salina os complexos formados mais encontrados são  $\text{RaSO}_4$ ,  $\text{RaCO}_3$ , e  $\text{RaCl}^+$ . As águas subterrâneas que possuem alta salinidade tendem a exercer menos adsorção do rádio às rochas, pois ocorre mudanças de pH, temperatura e disputa de outros cátions para a adsorção. Desta forma, o rádio tende a se concentrar na superfície do aquífero podendo assim originar uma fonte de  $^{222}\text{Rn}$  (MAHONEY et al., 1991; MOISE et al., 2000; STURCHIO et al., 2001; PORCELLI, 2008).

### 2.2.1.3 O Radônio ( $^{222}\text{Rn}$ )

O radônio é um gás inerte, incolor, inodoro e insípido, sendo 7,58 vezes mais pesado que o ar. Possui número atômico 86 e seu peso atômico de aproximadamente 222,0176 unidades de massa atômica. Apresenta ponto de fusão de  $-71\text{ }^{\circ}\text{C}$  e de ebulição  $-61,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ele possui 36 isótopos radioativos que variam na sua massa de 198 a 228. Em condições normais de temperatura e pressão este elemento apresenta-se no estado gasoso, sendo encontrado nos solos, nas rochas, na água e em materiais de construção (MAFRA, 2011; PETTA; CAMPOS, 2013; NADALETI et al., 2016; PERNA et al., 2018).

Os três isótopos naturais mais conhecidos e estudados são provenientes das três séries de decaimento radioativo tendo como radionuclídeo precursor, o rádio. O radônio possui três isótopos naturais: **1.** O  $^{222}\text{Rn}$  pertencente a série do  $^{238}\text{U}$ , oriundo do  $^{226}\text{Ra}$  com meia-vida física de 3,8 dias; **2.** O torônio ( $^{220}\text{Rn}$ ) pertencente a série do  $^{232}\text{Th}$ , oriundo do  $^{224}\text{Ra}$  possuindo meia-vida física de 55,6 segundos; **3.** O actinônio ( $^{219}\text{Rn}$ ) pertencente a série do  $^{235}\text{U}$ , oriundo do  $^{223}\text{Ra}$  possuindo meia-vida física de 3,9 segundos (CHYI, 2008; GAVIOLI et al., 2009).

Por meio da difusão molecular, o transporte do radônio é influenciado pelas propriedades físicas do solo como porosidade e permeabilidade. Ao emanar do solo, o  $^{222}\text{Rn}$  pode ser inalado e nos pulmões sofre decaimento liberando partícula alfa e seus descendentes que se depositam em forma de aerossóis no trato respiratório podendo ocasionar mutações, alterações cromossômicas e danos irreparáveis, que podem acarretar o câncer de pulmão (GAVIOLI et al., 2009; MAFRA, 2011).

Muitas águas minerais e termais contêm  $^{222}\text{Rn}$ , dissolvido na água em forma de bolhas sendo encontrado em concentrações maiores nas águas subterrâneas devido à reposição constante do decaimento do  $^{226}\text{Ra}$  e devido à pouca turbulência do meio, pois, escapa facilmente em lugares turbulentos como rios e córregos. Por não participar de processos químicos, o radônio tem seu transporte livre das rochas para as águas subterrâneas ou para a superfície através das fraturas das rochas e dos solos (FIANCO, 2011; PETTA; CAMPOS, 2013). Em meio saturado o fluxo é controlado pelas águas subterrâneas e em meio não saturado por difusão gasosa (REBELO et al., 2003). Verificar a presença deste radioisótopo na água subterrânea é de extrema importância, pois, a ingestão de água contendo altos teores de radônio apresenta um risco direto à saúde, podendo afetar células do aparelho gastrointestinal através de ionizações. E ocasionar patologias como os cânceres de osso, cabeça e estômago (JACOMINO et al., 1996). A OMS delimita que a sua concentração no ar

seja de no máximo 100 Bq/m<sup>3</sup> e o limite máximo para água foi determinado pela *United States Environmental Protection Agency* – USEPA sendo 11,1 Bq.L<sup>-1</sup> (USEPA, 1999; WHO, 2006).

## 2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS

Diante das informações expostas nos tópicos anteriores, o estudo das águas subterrâneas é de suma importância devido à presença de NORM e metais pesados. Dentre as técnicas que podem ser realizadas para avaliação da composição química desta matriz, podemos citar a Espectrometria de cintilação líquida e Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Estas técnicas foram empregadas no presente estudo e serão detalhadas a seguir.

### 2.3.1 Espectrometria de cintilação líquida (CLUBR)

A Espectrometria de Cintilação Líquida de Ultrabaixo Nível de Radiação de Fundo (CLUBR) foi desenvolvida por Prichard e Gesell (1977). Esta técnica pode ser utilizada para determinar concentrações de atividade de radionuclídeos presentes em amostras de água como o <sup>222</sup>Rn e <sup>226</sup>Ra. A técnica consiste na alta solubilidade do <sup>222</sup>Rn em tolueno, um solvente comumente utilizado no coquetel cintilador na contagem de cintilação líquida. As partículas radioativas emitidas pelo radônio e seus descendentes reagem ao coquetel cintilador emitindo fóton que são contabilizados. Vários autores citam que o espectrômetro Quantulus 1220 (PerkinElmer) tem sido amplamente utilizado para esta finalidade, pois possui alta eficiência de contagem de espectros para picos de radiação alfa e beta além de apresentar grande capacidade de analisar um alto número de amostras em um tempo relativamente curto. (SANCHEZ-CABEZA; PUJOL, 1995; MINGOTE; COSTA, 2016).

### 2.3.2 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A espectrometria de massa atômica é uma técnica versátil e muito utilizada na identificação de elementos em amostras. Esta técnica consiste da separação de elementos através dos seus próprios íons por meio da relação massa/carga (m/z). Existem várias adaptações desta técnica, dentre elas está a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) possuindo um baixo limite de detecção menor que 1 µg.L<sup>-1</sup>

e alta seletividade dos elementos. A técnica do ICP-MS consiste na ionização da amostra por meio da interação com o plasma do gás argônio, sendo gerados íons positivos que passam pelo discriminador de massa, podendo assim, detectar por espectro cada tipo de elemento (SKOOG, 2009).

O ICP-MS possui cinco etapas: **1º**) Introdução das amostras; **2º**) Gás ionizador (o plasma); **3º**) Focalização por defletores; **4º**) Analisador de elementos e **5º**) Detector de íons (SKOOG, 2009). A Figura 2 mostra as etapas do ICP-MS do modelo NexION 300, modelo este utilizado neste estudo.

Figura 2 – Etapas do ICP-MS.



Fonte: PERKINELMER, 2010.

## 2.4 RADIOECOLOGIA

O termo radioecologia foi descrito pela primeira vez por Eugene P. Odum em 1955, época de grande desenvolvimento de aplicações da energia nuclear. Porém, somente em 1959 ele definiu como uma disciplina que estuda substâncias radioativas, radiação e meio ambiente (ODUM, 1956; ODUM, 1959).

Por isso, a radioecologia é considerada uma ciência multidisciplinar que visa entender e quantificar através das grandezas dosimétricas o comportamento dos radionuclídeos e suas vias de transferência pelo ecossistema através de seus receptores, sendo eles, as plantas, os animais e o homem. Além disto, esta ciência também estuda a dose radiológica e os efeitos desta sobre o homem e o ambiente em que o mesmo vive. Dentre os fatores estudados estão: **a)** identificação dos principais radionuclídeos contribuintes para a exposição humana à radiação ionizante; **b)** avaliação quantitativa sobre os processos e mecanismos de transferências dos radionuclídeos no ecossistema para estudos no passado, presente e futuro; **c)** verificar possibilidades de medidas corretivas a curto e longo prazo (VANDECASTEELE, 2004).

## 2.5 BIOMONITORAÇÃO AMBIENTAL

A biomonitoração é a utilização de organismos como indicadores da saúde do ambiente em que estão inseridos. A utilização de espécies sentinelas (bioindicadores) tem sido tradicionalmente utilizada em estudos de biomonitoramento, incluindo avaliação de riscos ambientais, indicando um desequilíbrio ambiental de suas espécies ou comunidades em um ecossistema (USEPA, 2002; FRIBERG et al., 2011; MONROY et al., 2014).

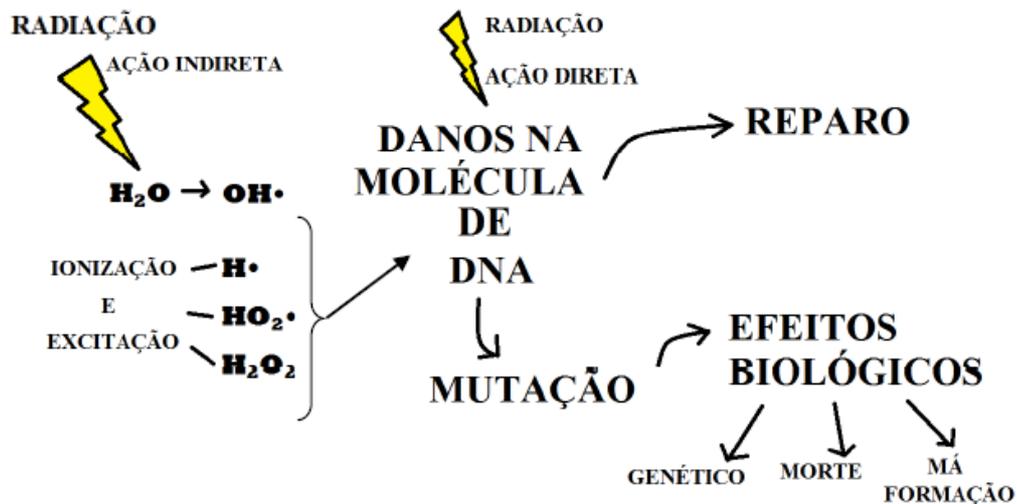
Os organismos-testes podem ser obtidos a partir de uma variedade de fontes, incluindo culturas laboratoriais ou populações selvagens. Fornecer detalhes sobre onde eles foram obtidos, como eles foram mantidos e informações sobre o controle das espécies testes é útil para determinar se uma amostra pode causar algum efeito nocivo, e se esse efeito nocivo pode prontamente ser detectado de forma confiável (BIRK et al., 2012; CAREW et al., 2013; HANSON et al., 2017).

Várias espécies são cultivadas e utilizadas em laboratório para testes de biomonitoração como insetos, plantas, líquens, moluscos, crustáceos, etc, com a finalidade de avaliar danos provenientes de uma determinada exposição a agentes físicos e químicos. Neste contexto, os principais critérios para seleção destas espécies são a sensibilidade a produtos químicos e físicos, conhecimento sobre sua biologia e ecologia, facilidade de manutenção laboratorial, ampla distribuição geográfica e estabilidade genética. Bioindicadores podem responder à contaminação por meio de alterações genéticas, fisiológicas, bioquímicas e por bioacumulação. A resposta de cada organismo é influenciada pelas condições físicas, químicas e biológicas do ambiente como temperatura, pH, umidade e radiação, assim como por suas condições fisiológicas e nutricionais (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006; BAGLIANO, 2012).

Os bioindicadores e os demais seres vivos respondem às radiações ionizantes quando estas depositam suas energias arrancando elétrons dos átomos das moléculas com os quais interagem podendo causar desestabilização, pois os átomos são unidos por forças eletrostáticas podendo causar quebra das moléculas e gerando um possível dano biológico. A ação de interação da radiação ionizante com a matéria é dividida em dois tipos: direta e indireta (Figura 3). Na ação direta ocorre a transferência da energia da radiação diretamente para a molécula, por exemplo o DNA, causando sua desestabilização, podendo causar mutações genéticas e morte celular. A ação indireta ocorre por meio de qualquer mecanismo que atue de forma indireta nas moléculas, sendo a radiólise a mais frequente, com a quebra da molécula da água gerando radicais livres que danificam outras moléculas importantes do

indivíduo ocasionando os danos biológicos. Entre os efeitos causados pelos danos biológicos provenientes das radiações ionizantes temos o aumento expressivo da quebra da molécula de DNA, aberrações cromossômicas, micronúcleos, binucleações celulares, apoptoses, etc (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; OKUNO, 2018).

Figura 3 - Interações da radiação ionizante com a matéria.



Fonte: Silva et al., 2014.

Para os testes de toxicidade aquática na biomonitoração, geralmente são utilizados organismos como peixes, moluscos, microcrustáceos, anfíbios e algas, que são expostos a determinadas concentrações das amostras por um período de tempo específico, com o objetivo de estudar os efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento das espécies, além dos danos de curto e longo prazo, ou seja, efeitos agudos e crônicos, respectivamente (KNIE; LOPES, 2005; CUNHA, 2011). A tecnologia aliada ao trabalho com esses organismos permite alcançar resultados que antes não poderiam ser identificados apenas utilizando aparelhos. Os organismos-teste podem apresentar sensibilidade aos efeitos da interação com substâncias e elementos químicos, como radionuclídeos, por meio dos sintomas de efeitos agudos ou crônicos até a mortalidade (KNIE; LOPES, 2005).

Dentre os modelos utilizados na biomonitoração se destacam os invertebrados sendo os mais representativos em testes padronizados. Seu uso como uma ferramenta de gestão para monitorar a mudança nos ecossistemas é visto de forma positiva. Dentre os invertebrados aquáticos, os moluscos da classe Gastropoda e Bivalvia são os mais aplicados em testes por possuírem uma alta sensibilidade a uma variedade ampla de poluentes. O molusco *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) vem sendo utilizado como indicador ambiental tanto

para agentes físicos (TALLARICO et al., 2015; SANTOS et al., 2018), quanto químicos (ESTEVAM et al., 2006; SILVA et al., 2008; LIMA et al., 2019). O uso dos moluscos *B. glabrata* tem recebido apoio devido a diferentes fatores como conhecimento biológico da espécie, ampla distribuição geográfica, curto ciclo de vida, fácil coleta, manutenção de baixo custo em condições laboratoriais e a reprodução contínua durante o ano inteiro (ESTEVAM et al., 2006; CANTINHA et al., 2010; ABEL, 2014; OLIVEIRA FILHO et al., 2017).

Estudos apontam a importância da realização de testes de toxicidade com organismos aquáticos para tê-los como um instrumento de alerta para um possível problema ambiental, uma vez que os compostos nocivos podem ser transmitidos indiretamente a outros organismos (ANDRADE JÚNIOR et al., 2013). Vários trabalhos relevantes utilizando o *B. glabrata* como bioindicador demonstram sua versatilidade em diversos estudos, dentre estes, estão o de Rocha Filho et al. (2015), Sá et al. (2016), Araújo et al. (2018), Silva et al. (2018), Lima et al. (2019) e Siqueira et al. (2020). No âmbito das radiações ionizantes estão presentes trabalhos como Melo et al. (1996), Okazaki et al. (1996), Melo et al. (2001), Tallarico et al. (2004), Silva et al. (2013), Siqueira et al. (2014), Santos et al. (2018) e Silva et al. (2018) que ressaltam a susceptibilidade deste bioindicador frente à radionuclídeos e os efeitos biológicos causados por eles.

### 2.5.1 O *Biomphalaria glabrata*

A classificação taxonômica do molusco *Biomphalaria glabrata* (Figura 4) é dividida em: **1) Reino:** Animalia; **2) Filo:** Mollusca; **3) Classe:** Gastropoda; **4) Subclasse:** Pulmonata; **5) Ordem:** Basommatophora e **6) Gênero:** *Biomphalaria*. Dentre as características que compõem as espécies da classe Gastropoda estão: (1) Torção da massa visceral (giro de 180° durante o desenvolvimento embrionário); (2) Presença de rádula (dentes quitinosos móveis dispostos em séries e manto ou pálio (massa visceral responsável pela síntese da concha)); (3) cavidade do manto: onde ocorrem a circulação, a respiração, a excreção e a reprodução; (4) Sistema circulatório aberto, respiração branquial, pulmonar ou tegumentar; (5) Tubo digestivo completo, isto é, com boca e ânus, além de glândulas anexas; (6) Sistema nervoso ganglionar; (7) Tentáculos: 1 ou 2 pares; (8) Concha: geralmente univalva e espiralada, porém pode ser reduzida e até mesmo estar ausente em algumas espécies e (9) Reprodução: hermafroditas ou dioicos (REY, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O habitat de preferência dos moluscos do gênero *Biomphalaria* são lugares que possuam água doce como pântanos, córregos e lagoas. Ocorrendo a sua colonização com o

auxílio de microflora rica, bastante matéria orgânica, boa insolação, temperatura média da água entre 20 °C e 26 °C, pH neutro tendendo a alcalino de 6,8 a 7,8. Sua alimentação é a base de folhas, bactérias, lodo, etc (NEVES, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O gênero *Biomphalaria* sp. é conhecido por apresentar espécies vetoras da esquistossomose, uma doença infecciosa parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. No Brasil, existem várias espécies deste gênero, porém, apenas três são as mais susceptíveis à infecção por *Schistosoma*, são elas: *B. tenagophila*, *B. straminea* e o *B. glabrata*.

Figura 4 - O molusco *Biomphalaria glabrata*.



Fonte: O autor, 2020.

A espécie *Biomphalaria glabrata* é o maior molusco da família Planorbidae, pois possui uma concha discoidal com seis a sete giros, sinistrógiras, enroladas em espiral plana sem opérculo. Sua periferia é arredondada tendendo para a direita, com o lado direito mais escavado que o esquerdo. Quanto ao tamanho, o animal pode variar de 40 mm de diâmetro e 11 mm de largura (REY, 2001; NEVES, 2005). Possuem concha planospiral sendo a cor natural da concha amarelo-palha, mas modifica-se em contato com substâncias corantes dissolvidas na água dos criadouros, como o óxido de ferro, que confere às conchas coloração mais escura, passando por vários tons de marrom até o negro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; REY, 2008).

A respiração pode ser realizada através do pulmão, pseudobrânquias e tegumento. Entre a massa visceral e o manto se encontra a cavidade palial, que é altamente vascularizada e dividida em câmara pulmonar ou saco pulmonar, câmara de entrada de água e de saída de água. A entrada de água fornece o oxigênio para a hematose e a saída de água retira as

excretas liberados pelo meato do ureter. No lado esquerdo do manto na região cefalopodal existem conjuntos de pregas que formam um orifício chamado de pneumóstoma, orifício que permite a entrada de ar para a cavidade palial, ocorrendo assim a hematose no saco pulmonar. A hematose ocorre na rede vascular da parede pulmonar, de onde o sangue flui para o coração através da veia pulmonar. A respiração aquática ocorre através de pseudobrânquias e do tegumento em contato com o meio líquido, permitindo uma vida anfíbia aos caramujos (MALEK, 1958; JURBERG et al., 1997; FERREIRA et al., 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; DUARTE, 2014).

O sistema reprodutor desses moluscos é hermafrodita, contendo uma única gônada com formato de glândula em cacho, chamada de ovoteste. Esta gônada é provida de numerosos folículos e cada um desses folículos produz os óvulos e espermatozoides que são formados lado a lado. Por viverem em grupos, os moluscos preferem realizar a fecundação cruzada, lhes dando uma maior variabilidade genética e realizando a autofecundação em circunstâncias críticas (NEVES, 2005; CANTINHA, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O sistema circulatório é composto por um coração que contém duas cavidades chamadas de aurícula e ventrículo. Por ser um sistema aberto, o sangue, também chamado de hemolinfa, sai dos vasos circulatórios banhando os tecidos, e posteriormente, é drenado pelos vasos retornando ao coração. A hemolinfa é constituída de elementos amebóides (hemócitos) e plasma. O plasma é rico em água, cloreto de sódio, bicarbonatos e hemoglobina que constitui 97% das proteínas totais presentes, desempenhando um papel importante no transporte de oxigênio (O<sub>2</sub>). Os hemócitos são as principais células efectoras do sistema de defesa do caramujo, podendo se mover dentro e fora dos tecidos (KNAAP; LOKER, 1990; BUGGE; WEBER, 1999; REY, 2001; PÊSSOA; MARTINS, 2011). Diferentemente dos outros invertebrados, a hemolinfa dos moluscos não apresenta grande capacidade de coagulação (IWANAGA, 1993).

A origem dos hemócitos ainda não está elucidada, alguns autores acreditam em uma origem multicêntrica a partir de células conjuntivas (SOUZA, 2006). Porém existem estudos que propõem que eles sejam produzidos em um órgão específico localizado na parede sacular renal, a qual forma parte do saco pericárdico e que foi denominado APO (Amebocyte Producing Organ) (SALAMAT; SULLIVAN, 2009).

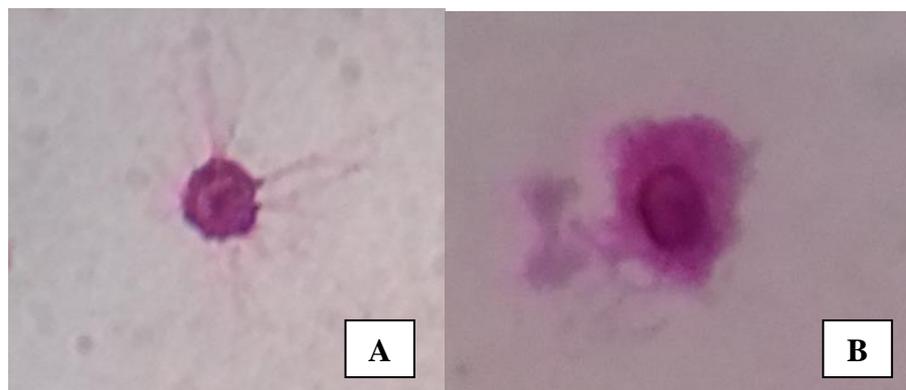
Os hemócitos apresentam um papel essencial no sistema de defesa dos moluscos, responsável pela atividade fagocitária, encapsulação, liberação de substâncias citotóxicas e transporte de cálcio para o reparo tecidual. Estas células assemelham-se aos macrófagos dos

animais vertebrados, devido a sua forma e funções (ABDUL-SALAM; MICHELSON, 1980; BAYNE et al., 1980; AMEN et al., 1992).

Existem dois tipos celulares de hemócitos, os granulócitos e hialinócitos, chamados também respectivamente de “estrelados” e “não estrelados”. O termo estrelado é devido a uma aparência celular estrelada semelhante às células nervosas. Os hemócitos foram diferenciados morfológicamente pelo tamanho, características morfológicas devido as suas organelas, projeções de prolongamentos citoplasmáticos e presença de grânulos citoplasmáticos observados ao microscópio óptico (CHENG, 1975; YOSHINO, 1976; CHENG; AULD, 1997).

Os granulócitos (Figura 5 - A) possuem muitos pseudópodes, tem uma média de 7-11  $\mu\text{m}$  de diâmetro, similares na aparência, em sua forma com os macrófagos dos animais vertebrados, executam funções de fagocitose e imobilização de parasitas por encapsulamento. Os seus grânulos basofílicos citoplasmáticos são conhecidos como lisossomos. São as maiores células e as mais prevalentes presentes na hemolinfa (CHENG; GARRABRANT, 1977; RATCLIFFE, 1985; BARRACCO et al., 1993; CAVALVANTI et al., 2012). Por sua vez, os hialinócitos (Figura 5 – B), possuem cerca de 5-8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, uma elevada relação núcleo-citoplasma, núcleo localizado na posição central, mais esféricas, não apresentam grânulos, pouca tendência para formar pseudópodes e escassos lisossomos. Suas funções ainda não estão tão bem elucidadas (CHENG; GARRABRANT, 1977; BARRACCO et al. 1993; CAVALCANTI et al., 2012).

Figura 5 - Hemócitos.



**A)** Granulócito e **B)** Hialinócito. Aumento 100x.

Fonte: O autor, 2020.

Em relação a sua embriologia, a partir de 40 a 113 dias de idade, o caramujo atinge a maturidade sexual e ovipõe, embora tenha sido observada oviposição em indivíduos precoces

de *B. glabrata* com até 18 dias de idade. A divisão do ovo de *B. glabrata* começa cerca de 15-30 minutos após a postura das desovas com um período embrionário de 6 (a 30 °C) a 8 dias (a 25 °C). Cada massa ovígera possui dezenas de embriões (KAWAZOE, 1976; KAWANO et al., 1992; NEVES, 2005; TELES; CARVALHO, 2008).

As divisões mitóticas começam após a fertilização dos ovos até alcançar o estágio de blástula (Figura 6), primeira fase do ciclo embrionário, onde ocorrem muitas proliferações celulares. Em seguida, ocorre o estágio de gastrulação, que é caracterizado pelo início de movimentações celulares dos embriões dentro dos ovos, e em seguida, a fase de organogênese, onde ocorrerá a formação de órgãos e o desenvolvimento de células germinativas. Após a eclosão, os embriões se alimentam de matéria orgânica disponível. (PIMENTEL, 1957; KAWAZOE, 1977; KAWANO et al., 2008; RAPADO et al., 2011; BANDOW; WELTJE, 2012).

Mortalidade e malformações no desenvolvimento embrionário (Figura 7) são apontadas como biomarcadores em testes de genotoxicidade, uma vez que são um dos efeitos da indução de mutações nas células germinativas (KAWANO et al., 1992; NAKANO et al., 2003).

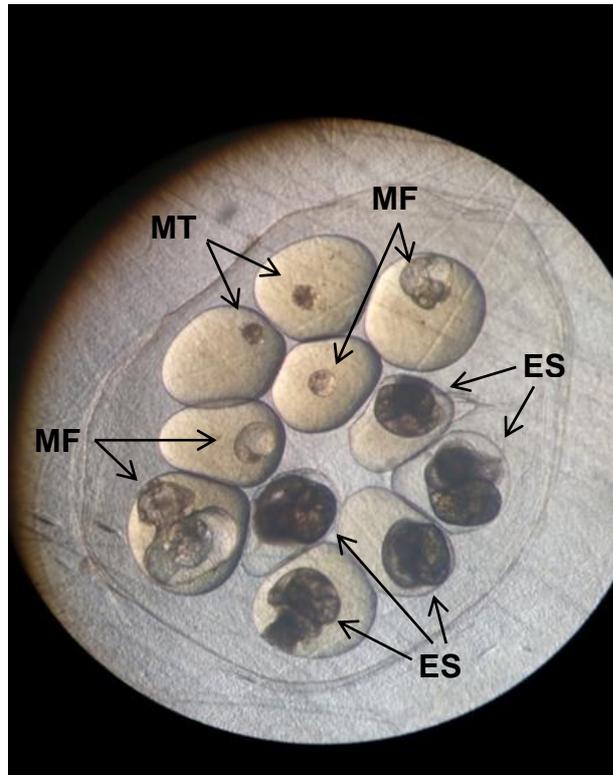
O estudo da embriologia de um organismo como o *Biomphalaria glabrata*, se torna importante em razão de se poder comparar o embrião normal com o malformado/morto, pois é um organismo utilizado em experimentos com diferentes substâncias químicas de origem sintética ou natural, para o seu controle na natureza, ensaios ecotoxicológicos e avaliações de biomonitoramento (BARBOSA, 1995; SÁ et al., 2016; ARAÚJO et al., 2018; SILVA et al. 2018).

Figura 6 - Desova de *Biomphalaria glabrata* no estágio de blástula.



Fonte: Autor, 2020. Aumento 400x.

Figura 7 - Alterações morfológicas embrionárias



**MF** – Embrião malformado; **MT** – Embriões mortos e **ES** – Embriões saudáveis. Aumento (400x).

Fonte: O autor, 2020.

## 2.6 TÉCNICAS DE ECOTOXICIDADE

Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, organismos-teste são expostos a diferentes concentrações de amostras e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (RIBO, 1997; DORNFELD, 2002; MEHARI et al., 2014).

A ecotoxicologia aquática tem como objetivo avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático. Os efeitos tóxicos podem se manifestar em diferentes níveis de organização, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades. Os testes de toxicidade aquática são bastante utilizados porque os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptáculos de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar

ou depositados nos solos (GOLDSTEIN et al., 1990; RAND, 1995; KENDAL et al., 2001; ADAMS et al., 2003).

Na detecção dos danos ocasionados nos sistemas biológicos, a ecotoxicologia faz uso de inúmeras metodologias, tais como: teste do micronúcleo, ensaio cometa, viabilidade celular, dentre várias outras (BICKHAM et al., 2000; HARTON; TEMPEST, 2012; LUZHNA et al., 2013). Entre os testes de genotoxicidade conhecidos, o ensaio cometa também conhecido como *comet assay* (CA) e o teste do micronúcleo (MN) são reconhecidos devido a sua precisão e sensibilidade, sendo o ensaio cometa usado na avaliação de quebras no DNA e o teste do micronúcleo em quebras cromossômicas. Tais efeitos podem ser considerados sinais de alterações no gene (HEUSER et al., 2008; ARALDI et al., 2015).

### **2.6.1 Toxicidade aguda e crônica**

Um elemento tóxico quando presente no meio ambiente, seja intencionalmente ou acidentalmente, é capaz de produzir respostas em vários organismos que habitam este ambiente. Produzindo conseqüentemente efeitos agudos e crônicos (COONEY, 1995).

Nos ensaios ecotoxicológicos, tem-se o teste de toxicidade aguda definido como aquele em que os efeitos adversos manifestam em curto espaço de tempo. Geralmente são realizados de 1 a 4 dias de exposição à amostra. Possui a finalidade de avaliar parâmetros de espécies jovens como o nascimento e a maturação sexual do indivíduo. Esses testes preveem respostas individuais, como mortalidade e alteração no metabolismo. Os ensaios de toxicidade crônica levam em consideração a resposta de populações, como parâmetros demográficos; de comunidades, como interação entre espécies; e/ou de ecossistemas inteiros, como interações totais. São realizados por um longo período de tempo de exposição demonstrando danos biológicos recorrentes, geralmente é usado para avaliar ciclos de vida de espécies (PERIN; BAUDO, 2005; COSTA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2008; OLIVEIRA FILHO et al., 2017).

### **2.6.2 Viabilidade celular**

Um dos métodos tradicionais de análise de viabilidade celular é o uso de coloração para a exclusão de células inviáveis por meio do corante Azul de Tripán, sendo contadas e analisadas as células por meio de um hemocítômetro. O teste consiste na coloração de células inviáveis que, ao terem sua membrana danificada, permitem o fluxo do corante para o seu

interior. Em contrapartida, as células viáveis não permitem este fluxo devido à permanência de integridade da membrana celular (LOUIS; SIEGEL, 2011).

### **2.6.3 Ensaio do micronúcleo**

O ensaio do micronúcleo foi descrito primeiramente por Schmid em 1975. O MN é amplamente utilizado na epidemiologia molecular e danos citogenéticos em populações expostas a agentes químicos e físicos. Os agentes clastogênicos são capazes de originar fragmentação cromossômica e os aneugênicos causam perdas cromossômicas durante a divisão celular, resultando assim em micronúcleos. Os micronúcleos são pequenas quantidades de DNA chamada de cromatina que são envoltos pela membrana nuclear durante a telófase podendo ser visualizados no citoplasma após o dano cromossômico. Uma elevada frequência de células contendo micronúcleos representa um alto grau de danos cromossômicos, representando assim, mutações cromossômicas ou genômicas sendo analisados frequentemente para fins de testes de genotoxicidade. Os micronúcleos podem ser únicos ou múltiplos e devem preencher os seguintes critérios: **1.** Estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal; **2.** Borda evidente, sugerindo membrana nuclear; **3.** Ter formato arredondado; **4.** Localização intracitoplasmática; **5.** Diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal (SCHMID, 1975; HEDDLE et al., 1983; FENECH, 2007; FLORES; YAMAGUCHI, 2008; TERRADAS et al., 2010; ARALDI et al., 2013; ANNANGI et al., 2016; HINTZSCHE et al., 2017). Além de representar perdas cromossômicas, os micronúcleos também retratam a amplificação do DNA quando de forma desordenada. Algo comumente observado no processos oncogênicos (BONASSI et al., 2007; TERRADAS et al., 2010).

#### **2.6.3.1 Binucleação celular**

A formação de células binucleadas provavelmente ocorre quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são puxados para polos opostos durante a anáfase. Neste caso, o DNA resultante da ponte é recoberto pelo envoltório nuclear. São células que podem ser formadas através de um processo de divisão celular incompleta ou como um resultado de uma divisão mitótica atrasada. Relatos na literatura indicam o aparecimento de células binucleadas devido a ações antrópicas com uso de agentes tóxicos e mutagênicos. Essa alteração serve

como um biomarcador de ações antrópicas e naturais em uma variedade de organismos em diversos ecossistemas (FENECH, 2000; RODILLA, 1993; SILVA et al., 2013).

#### 2.6.3.2 Apoptose

Apoptose ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo um mecanismo de defesa ativado quando os danos celulares não são mais passíveis de reparo (GRIVICICH et al., 2007). O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e certos processos patológicos, *in vivo*, inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento celular e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica. Portanto, a apoptose é um fenômeno indispensável para o controle da população celular prevenindo o organismo de possíveis patologias que acometam o controle celular no ser vivo (WYLLIE et al., 1980; MCCONKEY, 1998; MELO et al., 2000; ROCHA et al., 2007)

#### 2.6.4 Ensaio cometa

O ensaio cometa está se tornando uma importante ferramenta para o biomonitoramento ambiental. Este ensaio possui metodologia rápida, flexível, simples, sensível e de baixo custo, por isso tem sido utilizado em avaliações de genotoxicidade. São utilizadas células de diversas origens (células de sangue humano, biópsias de tecidos, linhagens celulares estabelecidas em cultura, etc.), submetidas a uma eletroforese sob condições alcalinas ( $\text{pH} \geq 13$ ). Nestas condições, um aumento na migração do DNA está associado com níveis elevados de quebras de cadeia simples e dupla da molécula. Quando visualizadas em microscopia de fluorescência, observam-se estruturas que se assemelham a cometas em que o DNA danificado se separa do DNA intacto. Os cometas são quantificados de acordo com seu grau de desintegração tendo-se o resultado da toxicidade (SINGH et al., 1988; LEE; STEINERT, 2003; SAKHVIDI et al., 2016; COLLINS et al., 2017).

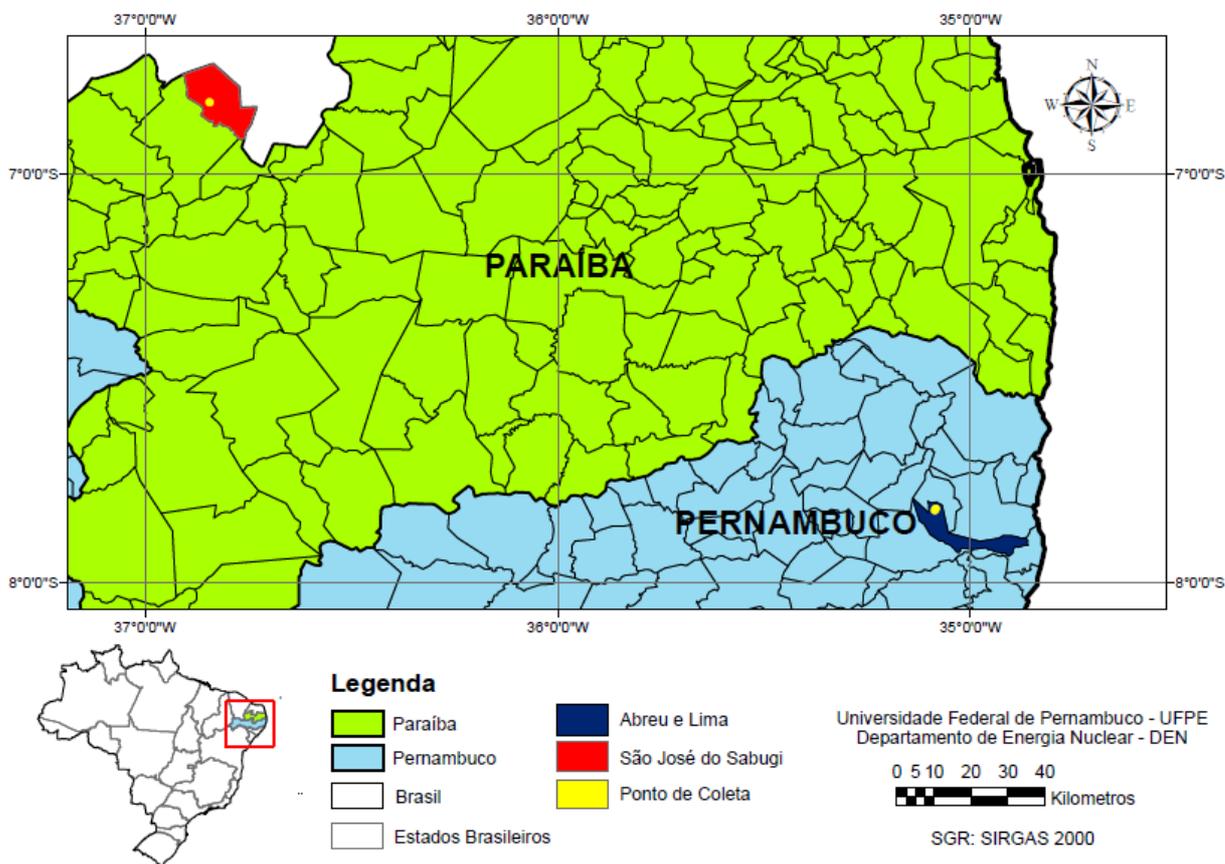
### 3 METODOLOGIA

Neste tópico são abordadas as metodologias utilizadas neste estudo bem como sua área de interesse.

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

A área de abrangência deste estudo inclui os estados da Paraíba e de Pernambuco. Conforme a Figura 8 as amostras de água foram coletadas nos municípios de Abreu e Lima em Pernambuco com dois pontos de coleta (P1 e P2) e São José do Sabugi na Paraíba com um ponto de coleta (P3). Estes estados e seus respectivos municípios foram selecionados com base em estudos prévios relacionados à presença de NORM nas regiões com importância epidemiológica e de interesse para a proteção radiológica, baseando-se nos estudos de Silva (2018) no município de São José do Sabugi – PB e Amaral et al. (2019) no município de Abreu e Lima – PE.

Figura 8 - Localização dos pontos de coleta.



Fonte: O autor, 2020.

### **3.1.1 Estado de Pernambuco**

O município de Abreu e Lima está localizado na Região Metropolitana do Recife (RMR) mais precisamente na Microrregião do Recife. Este município possui uma área territorial de 126,193 km<sup>2</sup>, densidade demográfica de 748,29 hab/km<sup>2</sup>, clima tropical, relevo costeiro assim como sua vegetação. Sua economia é voltada para o comércio, agropecuária e indústria tendo um PIB per capita de R\$ 13.438,04 reais. Este município assim como outros da RMR possui residências com uso de poços particulares devido à carência de abastecimento de água tubular pela empresa COMPESA (Companhia Pernambucana de Saneamento). O descontrole de criação de poços e o seu uso sem as medidas protetoras colocam em risco a vida das pessoas que as utilizam, assim como, a destruição do aquífero. Ainda não existe um estudo completo sobre os poços instalados nas residências dos municípios da RMR (MANOEL FILHO, 2004; CPRM, 2005a; IBGE, 2018). Foram coletadas águas de poços com influência de NORM em duas residências localizadas no bairro do Fosfato nas coordenadas em graus decimais: Ponto 1 = -7.892852, -34.895624 e Ponto 2 = -7.893888, -34.892851.

### **3.1.2 Estado da Paraíba**

O município de São José do Sabugi está situado na região Centro-Norte do Estado da Paraíba, Mesorregião da Borborema e Microrregião do Seridó Ocidental Paraibano. Abrangendo uma área territorial de 215 km<sup>2</sup> com densidade demográfica de 18 hab/km<sup>2</sup>, possui clima semiárido, relevo montanhoso e vegetação caatinga-seridó, sendo sua economia voltada principalmente para a agricultura com PIB per capita de R\$ 9.071,88 reais. Segundo um estudo realizado pela CPRM cerca de 40% dos poços cadastrados estudados deste município é destinado para o consumo humano, sendo predominante a presença de água salobra inadequada para a saúde humana (CPRM, 2005b; IBGE, 2018). Foi coletada água de um poço residencial de uma fazenda sob influência de NORM nas coordenadas em graus decimais: Ponto 3 = -6.784577, -36.790780.

## **3.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS**

As águas foram coletadas dos poços localizados na região metropolitana do Recife-PE e na região metropolitana de Patos-PB segundo a norma NBR 9.898 estabelecida pela

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Foram aferidas propriedades físico-químicas das amostras como pH e temperatura no ato da coleta, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos encontrados.

<b>Locais</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura</b>
<b>Ponto 1</b>	5.20	26 °C
<b>Ponto 2</b>	6.05	25 °C
<b>Ponto 3</b>	7.08	29 °C

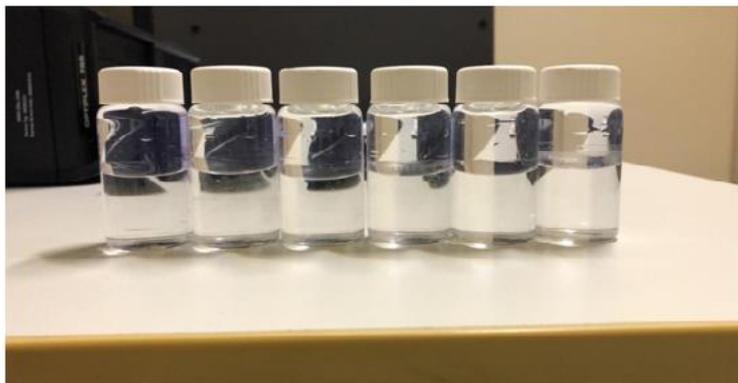
Fonte: O autor, 2020.

As amostras foram armazenadas em seis recipientes de vidros com capacidade de 823 mL, previamente descontaminados por 12 h com 1 M de HNO<sub>3</sub>. Antes de cada coleta ser iniciada, os recipientes foram ambientados com a amostra a ser coletada com três enxáguas. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em uma caixa térmica revestida com plástico para o mínimo atrito entre os recipientes. Posteriormente, três amostras foram enviadas para análise de metais pesados no SEAMB/CRCN-NE e outras três para os bioensaios no Laboratório de Radiobiologia (LR) no Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE.

### **3.2.1 Preparação das amostras para CLUBR**

Inicialmente antes da coleta, houve a preparação do coquetel cintilador a ser utilizado, composto por 1 L de p-xileno, 7 g de 2,5 difeniloxazol (PPO), e 0,75 g de 1,4 bis [2-(5-difeniloxazol)]-benzeno (POPOP). Foram transferidos 12 mL deste coquetel para recipientes de vidro com capacidade de 25 mL. No local da coleta foram retiradas alíquotas de 12 mL de cada amostra e transferidas para os recipientes contendo o coquetel cintilador (Figura 9). Os recipientes foram fechados e as amostras agitadas durante 5 minutos para extração do radônio para a fase orgânica. Para o branco analítico foram preparados em laboratório frascos de vidro contendo 12 mL de água destilada e 12 mL do coquetel de cintilação, sendo levado para campo de modo a emular possíveis contaminações nas amostras.

Figura 9 - Recipientes contendo o cintilador e amostras.



Fonte: O autor, 2020.

### 3.2.2 Preparação das amostras para ICP-MS

As amostras contendo as águas subterrâneas dos pontos de coleta foram posteriormente acidificadas com adição de 1 mL de ácido clorídrico (37%) e transferidas para tubos de polipropileno estéreis com capacidade máxima de 50 mL.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATIVIDADE DO $^{222}\text{Rn}$ E $^{226}\text{Ra}$ POR CLUBR

As leituras das amostras de PE e PB foram realizadas após um tempo mínimo de três horas após a coleta, suficiente para que o  $^{222}\text{Rn}$  entre em equilíbrio com seus radionuclídeos descendentes emissores de partícula alfa ( $^{214}\text{Po}$  e  $^{218}\text{Po}$ ). Foram analisadas duplicatas das amostras por meio da técnica CLUBR, sendo utilizado o Espectrômetro de Cintilação Líquida (LSC) fabricado pela PerkinElmer, modelo Quantulus 1220, do Laboratório de Cintilação Líquida do CRCN-NE. Após ter sido realizada a leitura de atividade do  $^{222}\text{Rn}$  nas amostras, foi esperado 28 dias para a ocorrência do equilíbrio secular com posterior análise da atividade do  $^{226}\text{Ra}$ . O tempo de contagem para as amostras e o branco foi de aproximadamente 100 minutos. Para a diferenciação dos espectros proveniente das partículas alfa e beta foi utilizada a ferramenta de discriminação de pulsos (PSA) que é um software do Quantulus 1220, cujo analisa espectros de radiações provenientes de soluções de concentrações padrões conhecidas e certificadas de radioisótopos, aumentando assim a eficiência do equipamento. Esta ferramenta é usada antes da análise das amostras aprimorando a eficiência de contagem do

equipamento. Este equipamento possui um limite de detecção de  $0.2 \text{ Bq.L}^{-1}$  para as amostras (PERKINELMER, 2002).

### 3.3.1 Qualidade do procedimento analítico da técnica CLUBR

A qualidade do procedimento analítico para determinar  $^{222}\text{Rn}$  em água é a mesma utilizada nos padrões internos para  $^{226}\text{Ra}$  do PNI-IRD/CNEN. A eficiência de contagem dos espectros (E) para a atividade do  $^{222}\text{Rn}$  é realizada antes da coleta das amostras utilizando uma solução padrão certificada e produzida pelo Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD), esta solução está diluída em 1:8 contendo uma atividade conhecida de  $^{226}\text{Ra}$  de  $1,445 \text{ Bq.L}^{-1}$  (Data de referência: 02/10/14) (SANTOS et al., 2017). Para diminuir a interferência da radiação de fundo do laboratório é feito o cálculo das amostras com o branco analítico ( $R_B$ ). A eficiência de contagem dos espectros é calculada após 28 dias da preparação das soluções padrão, período para que o  $^{222}\text{Rn}$  da solução padrão entre em equilíbrio secular com o  $^{226}\text{Ra}$  inicial ( $R_A$ ), utilizando a Equação 1:

$$E = \frac{R_A - R_B}{60 \times V \times A \times e^{-\lambda t} \times 3} \quad (1)$$

$R_A$  = Taxa de contagem da solução padrão (cpm).

$R_B$  = Taxa de contagem do branco analítico (cpm).

60 = Fator de conversão de cpm para cps.

3 = Fator de conversão para os emissores alfa presentes na amostra ( $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{218}\text{Po}$  e  $^{214}\text{Po}$ ).

V = Volume da solução padrão.

A = Atividade de concentração da solução padrão de  $^{226}\text{Ra}$ .

$\lambda$  = Constante de desintegração do  $^{222}\text{Rn}$  ( $\text{min}^{-1}$ ).

t = Tempo entre a coleta e metade do tempo de contagem (min).

Após ter o conhecimento da eficiência de contagem do equipamento, é realizado o cálculo da concentração de atividade do  $^{222}\text{Rn}$  das águas de poços utilizando a Equação 2, de acordo com ASTM (1998):

$$A = \frac{R_A - R_B}{60 \times V \times E \times e^{-\lambda t} \times 3} \quad (2)$$

A = Atividade de concentração do  $^{222}\text{Rn}$ .

$R_A$  = Taxa de contagem de amostra (cpm).

$R_B$  = Taxa de contagem do branco analítico (cpm).

60 = Fator de conversão de cpm para cps.

3 = Fator de conversão para os emissores alfa presente na amostra ( $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{218}\text{Po}$  e  $^{214}\text{Po}$ ).

V = Volume da amostra.

E = Eficiência de contagem.

$\lambda$  = Constante de desintegração do  $^{222}\text{Rn}$  ( $\text{min}^{-1}$ ).

t = Tempo entre a coleta e metade do tempo de contagem (min).

Foi realizada avaliação do procedimento analítico com a utilização de materiais de referências e soluções padrões por meio da utilização do Número En, conforme a Equação 3: Sendo calculadas as incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança de todos os resultados analíticos obtidos (ISO, 2015).

$$E_n = \frac{V_{obt} - V_{ref}}{\sqrt{U_{obt}^2 + U_{ref}^2}} \quad (3)$$

$V_{obt}$  = Valor obtido experimentalmente.

$V_{ref}$  = Valor do material de referência.

$U_{obt}$  = Incerteza expandida em nível de 95% de confiança do valor obtido.

$U_{ref}$  = Incerteza expandida em nível de 95% de confiança do valor do material de referência.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR ICP-MS

Antes de iniciar a análise química dos elementos presentes nas águas de poços artesianos, foi realizada a calibração dos parâmetros eletrônicos e analíticos através de uma solução padrão contendo  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Berílio, Cério, Ferro, Índio, Lítio, Magnésio, Chumbo e Urânio. Determinando assim parâmetros como potência, fluxo do gás de nebulização, fluxo do gás auxiliar, fluxo do gás refringente, temperatura de aquecimento e resfriamento,

potencial de viés do quadrupolo e voltagem do multiplicador. Foi efetuada a verificação da razão CeO/Ce, cujo valor não ultrapassou 2,5%. As particularidades citadas acima proporcionam uma maior estabilidade, sensibilidade e flexibilidade das análises realizadas. A calibração elementar do equipamento foi realizada por meio de curvas analíticas elaboradas com utilização de solução padrão (Merck®) multielementar de ETR, sendo empregadas como materiais de referências para urânio e tório. Após a calibração, foi iniciada a análise das amostras em duplicata no ICP-MS, sendo transferidos 50 mL de cada amostra da água de poço residencial para tubos de polipropileno estéreis. Foram analisados os metais pesados mais relevantes da radioatividade natural o  $^{232}\text{Th}$  e  $^{238}\text{U}$  no modelo NexION 300D da PerkinElmer do SEAMB/CRCN-NE.

### 3.4.1 Qualidade do procedimento analítico da técnica de ICP-MS

Para a qualidade do procedimento analítico foram empregados parâmetros de precisão e exatidão por meio da utilização de solução padrão e material de referência (curva analítica), respectivamente. A incerteza analítica dos resultados obtidos por ICP-MS foi estimada a partir da combinação das incertezas individuais relativas de precisão (desvio de solução padrão) e exatidão (desvio de resultados com material de referência). As incertezas analíticas foram expandidas em nível de 95% de confiança, conforme o guia EURACHEM/CITAC CG4 (ELLISON; WILLIAMS, 2012). A qualidade do procedimento analítico foi realizada por meio do Teste Z com a faixa adequada para os resultados dos materiais de referência de -2 a 2, conforme recomendação da ISO 13528:2015 (ISO, 2015). A fórmula do Teste Z é descrita na Equação 4:

$$Z = \frac{V_{\text{ref}} - V_{\text{med}}}{I_n} \quad (4)$$

Z = Teste Z

$V_{\text{ref}}$  = Valor do material de referência (solução fortificada).

$V_{\text{med}}$  = Valor da média das concentrações da solução fortificada.

$I_n$  = Incerteza analítica expandida a 95% de confiança do material de referência.

O limite de detecção do método utilizado para os elementos do  $^{238}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$  foi a concentração mínima detectável realizado por meio do desvio padrão de 7 réplicas do branco

analítico constituído de água MiliQ, conforme a norma DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2011). A fórmula do limite de detecção (LD) é descrita na Equação 5:

$$LD = 3 \times \text{Desv}_{pd} \quad (5)$$

LD = Limite de Detecção.

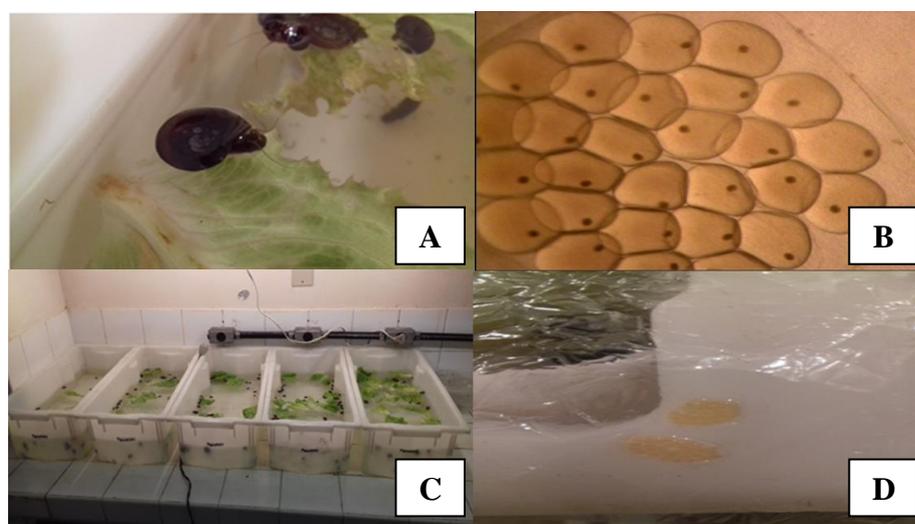
3 = Fator de confiança do limite de detecção em 98%.

Desv<sub>pd</sub> = Valor do desvio padrão das sete réplicas do branco analítico.

### 3.5 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DO MOLUSCO *BIOMPHALARIA GLABRATA*

Foram utilizados para os experimentos moluscos adultos e embriões da espécie *B. glabrata* pigmentados (Figura 10 – A e B). Estes animais são mantidos no moluscário do Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE (Figura 10 – C) em recipientes com capacidade para 20 L de água, pH ~ 7,0 e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. A alimentação dos moluscos é realizada diariamente com alface (*Lactuca sativa*) orgânico e a troca da água filtrada e decolorada ocorrem uma vez por semana, com recolhimento das respectivas desovas (Figura 10 – D). Os moluscos adultos utilizados nos experimentos possuíam no mínimo dois meses de idade com diâmetro de concha variando de 10 a 15 mm, sendo medidas com o auxílio de um paquímetro, com posterior exposição aguda de 48 h as águas de poços para cada experimento.

Figura 10 - Manutenção dos caramujos *B. glabrata*.



**A)** *Biomphalaria glabrata* pigmentado adulto; **B)** Cubas de criação dos moluscos; **C)** Massa ovígera de *B. glabrata* pigmentado; **D)** Embriões de *B. glabrata* vistos no microscópio estereoscópico (400x).

Fonte: Autor, 2020.

### 3.6 EMBRIOTOXICIDADE

Este experimento seguiu a metodologia proposta por Okazaki et al. (1996). Foram utilizados embriões no estágio embrionário de blástula, sendo analisada a viabilidade durante um período de 9 dias com auxílio de microscópio estereoscópico (Wild HeerBrugg®). O experimento constou dos seguintes grupos: grupo controle negativo com água filtrada e decolorada e grupo das amostras das águas de poços P1, P2 e P3. Cada grupo foi composto por aproximadamente 100 embriões de desovas provenientes dos aquários, a exposição ocorreu por 48 h e os parâmetros analisados foram: frequência de viabilidade (eclosão) e inviabilidade (mortos e malformados). O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.7 CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DAS ÁGUAS DE POÇOS

Para avaliar a citotoxicidade das águas dos poços das regiões em estudo foram utilizados como parâmetro o teste de viabilidade celular e o ensaio do micronúcleo (MN). O estudo de genotoxicidade foi realizado por meio do ensaio cometa com células hemocitárias dos moluscos adultos. Os animais utilizados nos experimentos foram separados em grupo controle negativo (água filtrada e decolorada) e grupo exposto às águas de poços (P1, P2 e P3) com um total de 300 mL de amostra por grupo. Foram empregados cinco animais por grupo em um total de vinte animais por experimento. Nos bioensaios, os moluscos adultos foram expostos às águas de poços por 48 h.

#### 3.7.1 Viabilidade celular (Azul de Tripán)

Para a realização do teste de viabilidade celular foram realizadas modificações da metodologia de Louis e Siegel (2011). Para cada um dos cinco moluscos dos grupos expostos e controle negativo com água filtrada e decolorada, foram coletadas 20 µL de hemolinfa, adicionada ao corante Azul de Tripán (0,4%) na proporção 1:1 em microtubo com capacidade para 1,5 mL (Eppendorf® LoBind microcentrifuge tubes). Em seguida, o homogenato de 10 µL foi colocado no hemocitômetro (Câmara de Neubauer Espelhada, Bright-Line) e permaneceu em repouso por 3 min em temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C. Posteriormente, foi realizada a análise e quantificação da viabilidade celular por meio do microscópio óptico com a utilização da objetiva de 40x. Foram observados os quatro quadrantes (A + B + C + D) destinados para contagem e avaliação das células. A média das quatro leituras foi multiplicada

por  $10^4$  para obtenção do número de células por mL, sendo posteriormente multiplicado por 2 referente a diluição de 1:1 com o corante. As Equações (6 e 7) mostram como foi realizado o cálculo.

$$\text{Número total de células viáveis ou inviáveis} = \frac{(A + B + C + D)}{4} \times 2 \times 10^4 \quad (6)$$

$$\% \text{ de células (viáveis e inviáveis)} = \frac{\text{Número de células (viáveis ou inviáveis)}}{\text{Número total de células}} \quad (7)$$

### 3.7.2 Ensaio do micronúcleo (MN)

Para cada um dos cinco moluscos expostos foi coletado 100  $\mu$ L de hemolinfa adicionando o mesmo volume de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) sendo colocado em lâminas de microscopia onde as mesmas foram para uma câmara úmida, evitando assim o ressecamento laminar e a coagulação da hemolinfa por 40 min. Posteriormente a este tempo, para a fixação celular foram adicionados 200  $\mu$ L de glutaraldeído à 1% por 10 min, em seguida, as lâminas foram retiradas da câmara úmida e enxaguadas com uma solução de Ringer e coradas com o corante Giemsa à 5% por 5 min. As lâminas foram lavadas novamente com o Ringer e deixadas para secar em temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram analisadas no microscópio óptico com objetiva de 100x (SILVA et al., 2013). Para cada grupo, foram analisadas 1000 células, o experimento foi feito em triplicata. Durante a análise, além do micronúcleo (MN), também foram contabilizadas outras alterações celulares como binucleação celular e apoptose.

### 3.7.3 Ensaio cometa em moluscos *B. glabrata*

Foi utilizado o ensaio alcalino cometa (eletroforese em gel de célula única) que foi descrito por Singh et al. (1988), com modificações. Hemócitos extraídos após 48 h de exposição do *B. glabrata* foram utilizados neste ensaio de acordo com Grazeffe et al. (2008), para avaliar a atividade genotóxica proveniente das águas de poços. Para cada animal, foi coletado 100  $\mu$ L de hemolinfa e homogeneizada em 100  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Sigma-aldrich®) dissolvida em Tampão Fosfato Salino, PBS, (pH 7,4). Posteriormente, este homogenato foi colocado sobre uma lâmina de microscópio, previamente

coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5% (Sigma-aldrich®) dissolvida também no mesmo tampão, coberta com uma lamínula e mantido a 4 °C (10 min). Em seguida, a lamínula foi retirada e incubada em uma solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton-X 100 1% e DMSO 10%, pH 10) por 12 h a 4 °C. Após o processo de lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução de tampão alcalino, pH 13 (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM), ficando em incubação por 20 min a 4 °C. Posteriormente a este tempo, a eletroforese foi iniciada por 20 min (4°C) a 0,74 V/cm e 300 mA. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com o tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) por 15 min e fixadas com álcool absoluto por 10 min.

Passada a eletroforese, ocorreu a coloração das lâminas com 50 µL de uma solução de SYBER safe (Invitrogen) (1:500 em água destilada) no ato da leitura. Foram analisadas 100 células por lâmina em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) em aumento de 400x, com um filtro de emissão de 500-550 nm. O experimento foi realizado em triplicata com utilização de grupo controle negativo contendo água filtrada e declorada, grupo amostral e grupo controle positivo composto de Metil Metano Sulfanato (MMS).

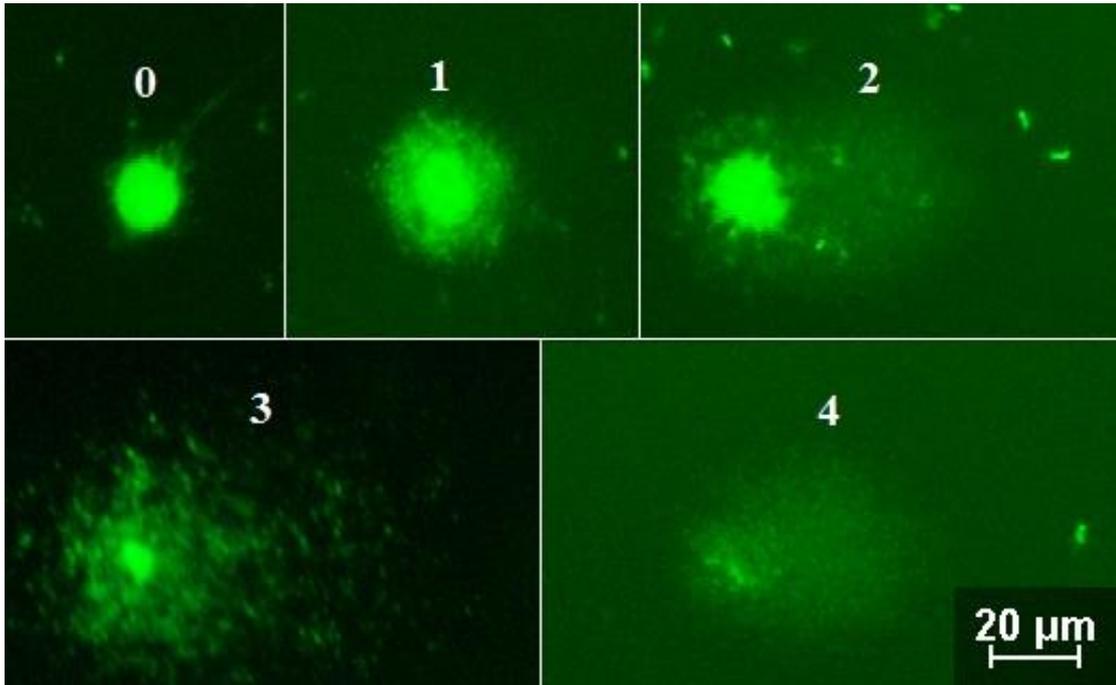
A análise visual de danos ao DNA foi realizada de acordo com Collins et al. (2008) em que os nucleóides são divididos em 5 categorias de dano ao DNA (0 – 4), dependendo da extensão do dano (Figura 11). A categoria 0 indica que não ocorreram danos, já as categorias de 1 a 4 indicam danos em níveis crescentes sobre o material genético. Para avaliar o grau de dano genético, foram utilizados os parâmetros: Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%). O ID foi calculado multiplicando o nível de dano pela quantidade de cometas correspondente ao mesmo, como descrito na Equação 8:

$$\text{ID} = 0 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas nível } 0) + 1 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas nível } 1) + 2 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas nível } 2) + 3 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas nível } 3) + 4 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas nível } 4) \quad (8)$$

O FD% foi calculado como o valor percentual de todos os cometas com dano ao DNA (nível 1 – 4) em relação ao número total de cometas (nível 0 – 4), de acordo com a Equação 9:

$$\text{FD}\% = \frac{[(\text{N}^\circ \text{ total de cometas} - \text{N}^\circ \text{ de cometas } 0) \times 100]}{\text{N}^\circ \text{ total de cometas}} \quad (9)$$

Figura 11 - Categorias do cometa segundo migração do DNA dos hemócitos de *B. glabrata*.



Fonte: O autor, 2020.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes de viabilidade celular e embriotoxicidade foram utilizados os métodos ANOVA e Tukey e para o teste cometa foram utilizados os métodos ANOVA e Bonferroni. Ambos os testes foram realizados por meio do programa estatístico GraphPad Prism versão 5 sendo considerados significativos os resultados que apresentarem  $p < 0,05$ . Para avaliação dos testes radiométricos, assim como, o agrupamento de dados radiométricos com os bioensaios foi utilizando o programa Statistica versão 10. Os resultados radiométricos e do teste do micronúcleo foram mostrados em modelos tabulares.

## 4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS

Neste tópico são abordados os resultados encontrados neste estudo assim como suas respectivas discussões.

### 4.1 QUALIDADE DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Determinar a qualidade do procedimento analítico é fundamental para pesquisas de monitoração ambiental. Por isso, foram verificadas as metodologias utilizadas para a avaliação radiométrica nas águas de poços artesianos sob influência de NORM. Foram utilizados dois materiais de referências provenientes do Programa Nacional de Intercomparação do Instituto de Radioproteção e Dosimetria - PNI/IRD para o Espectrômetro Cintilação Líquida (LSC) (Tabela 3). Devido à ausência de material de referência para ICP-MS foi utilizada a curva analítica elementar de urânio e tório como referência analítica (Tabela 4).

Tabela 3 - Valores obtidos e de referência para o controle da qualidade do procedimento analítico (LSC)

Data de referência	Amostras	Concentração de atividade* de $^{226}\text{Ra}$ em equilíbrio com $^{222}\text{Rn}$ ( $\text{Bq.L}^{-1}$ )		Número $E_n$
		Valor obtido	Valor de referência	
16/01/2017	1	$1,1 \pm 0,3$		-0,67
	2	$1,1 \pm 0,3$	$1,400 \pm 0,21$	-0,71
	3	$1,1 \pm 0,3$		-0,68
12/06/2017	1	$0,6 \pm 0,3$		-0,09
	2	$0,6 \pm 0,3$	$0,640 \pm 0,10$	-0,12
	3	$0,6 \pm 0,3$		-0,08

\*Média  $\pm$  incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança.

Fonte: O autor, 2020.

Os valores do Número  $E_n$  que foram calculados encontraram-se entre -1 e 1 seguindo a norma (ISO 13528, 2015), variando entre -0,71 a -0,08. Os desvios padrões foram calculados para 95% de confiança conforme o guia EURACHEM/CITAC CG4 (ELLISON; WILLIAMS, 2012). Os resultados garantem a qualidade do procedimento analítico utilizado para a

determinação de  $^{222}\text{Rn}$  e  $^{226}\text{Ra}$  em águas de poços subterrâneos por Espectrometria de Cintilação Líquida deste estudo.

Tabela 4 - Valores obtidos e de referência para o controle da qualidade do procedimento analítico (ICP-MS)

<b>Metais</b>	<b>Valor Obtido</b>	<b>Valor de Referência</b>	<b>Teste Z</b>
<b>Urânio</b>	6,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$	6,34 $\pm$ 0,21	1,7
<b>Tório</b>	6,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	6,66 $\pm$ 0,24	0,8

Fonte: O autor, 2020.

Os valores do Teste Z que foram calculados encontraram-se entre -2 e 2 seguindo a norma (ISO 13528, 2015), variando entre 0,8 a 1,7. Os desvios padrões foram calculados para 95% de confiança conforme o guia EURACHEM/CITAC CG4 (ELLISON; WILLIAMS, 2012). Os resultados obtidos garantem a qualidade do procedimento analítico utilizado para a determinação de  $^{238}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$  em águas de poços subterrâneos por Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

#### 4.2 ANÁLISE RADIOMÉTRICA DO $^{222}\text{Rn}$ E $^{226}\text{Ra}$

Os resultados da determinação da concentração de  $^{222}\text{Rn}$  e  $^{226}\text{Ra}$  nas amostras estudadas foram obtidos utilizando Espectrometria de Cintilação Líquida de Ultraabaixa Radiação de Fundo – CLUBR, sendo mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Média das concentrações do  $^{222}\text{Rn}$  e  $^{226}\text{Ra}$  nas águas de poços.

<b>Locais</b>	<b>Radônio (<math>^{222}\text{Rn}</math>)</b>	<b>U</b>	<b>Rádio (<math>^{226}\text{Ra}</math>)</b>
<b>Ponto 1</b>	*79,35 $\text{Bq.L}^{-1}$	$\pm$ 1,42	< 1 $\text{Bq.L}^{-1}$
<b>Ponto 2</b>	*206,13 $\text{Bq.L}^{-1}$	$\pm$ 2,55	< 1 $\text{Bq.L}^{-1}$
<b>Ponto 3</b>	*220,79 $\text{Bq.L}^{-1}$	$\pm$ 2,62	< 1 $\text{Bq.L}^{-1}$

U = Média da incerteza analítica; \* = Valores acima do limite recomendando pela USEPA (11,1  $\text{Bq.L}^{-1}$ )

Fonte: O autor, 2020.

Estes resultados demonstram que a presença do radônio nas águas subterrâneas estudadas foi elevada em todos os pontos amostrais, onde pode-se observar que no ponto 1 o limite do radônio foi cerca de sete vezes maior que o recomendado pela USEPA (1999) que é de  $11,1 \text{ Bq.L}^{-1}$ . Nos pontos 2 e 3 os valores ultrapassaram cerca de dezoito e dezenove vezes o limite recomendado, respectivamente. A alta presença deste radionuclídeo nas águas de poços estudadas pode ser explicada pela existência do fosfato uranífero em que essas águas subterrâneas estão submetidas. Quanto aos Pontos 1 e 2, um estudo mostrou que no ano de 1949 o município de Abreu e Lima possuía a presença de elevadas concentrações de NORM do fosfato uranífero. Esta área foi estudada e detalhada em 1974 que demonstrou a presença de uma faixa sedimentar costeira constituída de jazidas de rochas carbonáticas de origem fossilíferas denominado de fosforitos. A presença do urânio no fosfato foi oriunda da sua dissolução em água costeira através de lixiviações, sendo depositados nos poros das palhetas dos minerais fosfáticos havendo a troca química do  $\text{Ca}^{+2}$  presente nos fosfatos pelo  $\text{U}^{+4}$  (DUARTE, 1949; SAAD, 1974; AMARAL, 1994).

Trabalhos realizados por Almeida (1978), Amaral (1994), Lima (1996) e Silva (2000) demonstram a importância dos estudos hídricos nas regiões urano-fosfática da Região Metropolitana do Recife devido a sua influência sobre a população local pelo consumo e exposição à NORMs. O estudo realizado por Amaral et al. (2019) também observou elevada concentração de radônio em águas subterrâneas no município de Abreu e Lima o que corrobora com os dados deste trabalho.

Quanto ao Ponto 3, em 1972 foram realizados os primeiros estudos radiométricos no nordeste brasileiro com a parceria das Empresas Nucleares Brasileiras S/A (NUCLEBRÁS) e a Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM). Por meio desses estudos foi constatada a presença de urânio, tório e seus descendentes no estado da Paraíba, sendo descoberta uma das principais jazidas de urânio no Brasil, além de identificar áreas anômalas com a presença de NORM (BIZZI, 2003). Segundo Pastura et al. (2011), o estado da Paraíba possui extensas áreas sedimentares e de granito/pegmatito. Essas rochas apresentam minerais com diferentes teores de radionuclídeos das séries do urânio e tório, que contribuem significativamente para a elevação dos níveis de radiação de fundo. Relevantes trabalhos foram realizados nesta região como Araújo (2015), Santos Júnior (2017) e Silva (2018) em que demonstraram concentrações altas de NORMs nos compartimentos do ecossistema.

No Brasil, estudos que constataram elevadas concentrações de radônio em águas subterrâneas já foram realizados como Bonotto e Melo (2006) que estudaram a cidade de Novo Horizonte – SP encontrando amostra com  $155 \text{ Bq.L}^{-1}$ , Fianco (2011) que na cidade de

Porto Alegre – RS encontrou amostra de  $508 \text{ Bq.L}^{-1}$  e Corrêa et al. (2015) que estudaram a cidade de Curitiba – PR e encontraram amostra com  $215 \text{ Bq.L}^{-1}$ . Todos estes estudos associam a presença de radônio ao solo rico em urânio, semelhante aos dados encontrados neste trabalho.

Trabalhos realizados em outros países também observaram elevadas concentrações de  $^{222}\text{Rn}$  em águas subterrânea devido a presença de NORM como o estudo realizado por Moreno et al. (2018) que estudaram a região norte de Maladeta na Espanha, encontrando valores de até  $346 \text{ Bq.L}^{-1}$  nas águas de poços. Tan et al. (2019) observaram que águas de poços localizadas na cidade de Zhangjiapu na China alcançaram  $31,31 \text{ Bq.L}^{-1}$  e Seminsky e Seminsky (2019) estudando a região de Baikal, noroeste da Rússia, encontraram alta radioatividade oriunda do radônio nas águas subterrâneas,  $4.862 \text{ Bq.L}^{-1}$ . Todos os autores sugerem que a presença desta radioatividade está associada à presença de urânio no fundo dos poços. Na China, os autores também associaram a presença do urânio às rochas magmáticas e pelo sistema magmático-hidrotérmico no solo em que foi escavado o poço artesiano. Os estudos citados comprovam a presença deste radionuclídeo em vários países exercendo sua radioatividade sobre as pessoas, sendo, portanto, relevante seu estudo e determinação da concentração de sua radioatividade para fins de proteção radiológica.

Os resultados da aferição da concentração de  $^{226}\text{Ra}$  nas águas dos poços Abreu e Lima e São José do Sabugi ficaram abaixo do limite recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011) que é de  $1 \text{ Bq.L}^{-1}$ . Sugere-se que a baixa concentração do  $^{226}\text{Ra}$  pode ser explicada pela interação do radionuclídeo com os minerais presentes e o pH da água das amostras. Segundo Porcelli (2008), o rádio na presença de baixo pH torna-se um elemento com alta mobilidade na água, podendo não se concentrar neste meio. Em relação ao Ponto 3, um estudo de Andrews et al. (1989) observaram a baixa concentração de rádio em águas subterrâneas provocada pela absorção pelo granito, mineral este encontrado no solo do município de São José do Sabugi.

Outros trabalhos também constataram alta concentração de  $^{222}\text{Rn}$  e baixa concentração de  $^{226}\text{Ra}$  em águas subterrâneas, como Almeida et al. (2004) que estudaram Região dos Lagos-RJ encontrando concentrações baixas que variavam de  $< 0,002$  a  $0,4 \text{ Bq.L}^{-1}$ , Lauria et al. (2004) que avaliaram poços adjacentes a cidade de Goiânia-GO encontrando teores que variavam de  $< 0,02$  a  $0,05 \text{ Bq.L}^{-1}$  e Lamontagne et al. (2008) que estudando águas subterrâneas no sul da Austrália, observaram valores de  $0,00032$  a  $0,2 \text{ Bq.L}^{-1}$ . Diante do exposto, torna-se importante a avaliação de outros elementos químicos de importância para

avaliação da qualidade da água e dos radionuclídeos responsáveis pela concentração de radônio nas águas subterrâneas.

#### 4.3 ANÁLISE RADIOMÉTRICA DO $^{238}\text{U}$ E $^{232}\text{Th}$

Foram investigados os precursores das séries radioativas naturais, sendo também recomendada a identificação deles pela Portaria N° 2.914/11 do Ministério da Saúde para avaliar a qualidade da água subterrânea. Na Tabela 6 podem ser observados os dados da determinação das concentrações de  $^{238}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$  nas amostras de água de poços dos municípios de Abreu e Lima e São José do Sabugi. Os valores encontrados foram obtidos por meio do ICP-MS levando em consideração o limite de detecção instrumental para cada metal segundo a norma DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2011).

Tabela 6 – Média das concentrações de  $^{238}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$  nas águas de poços.

<b>Locais</b>	<b>Urânio (<math>^{238}\text{U}</math>)</b>	<b>U</b>	<b>Tório (<math>^{232}\text{Th}</math>)</b>
<b>Controle</b>	0,55 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,12 $\mu\text{g.L}^{-1}$	< LD
<b>Ponto 1</b>	4,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,85 $\mu\text{g.L}^{-1}$	< LD
<b>Ponto 2</b>	1,16 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$	< LD
<b>Ponto 3</b>	441,33 $\mu\text{g.L}^{-1}$	90,79 $\mu\text{g.L}^{-1}$	< LD

U = Incerteza analítica estimada a 95% de confiança; LD = Limite de Detecção; Controle = Água filtrada e decolorada; Abreu e Lima = Ponto 1 e 2 e São José do Sabugi = Ponto 3.

Fonte: O autor, 2020.

Segundo a Portaria N° 2.914/11 os valores máximos permitidos para a presença de urânio em água potável é 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Não sendo reportado limite para o tório. Dificuldades para a determinação deste metal em água são esperadas, pois este metal apresenta alta absorção por minerais e baixa solubilidade (PORCELLI, 2008). A concentração de tório encontrada nas águas subterrâneas deste estudo estão abaixo do limite de detecção (0,32  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) estando de acordo com a concentração média que é normalmente encontrada para este elemento na literatura especializada, sendo abaixo de < 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (PHILLIPS; WATSON, 2015).

As concentrações de urânio encontradas ficaram acima do limite de detecção (0,29  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e ao analisá-las nos pontos 1 e 2 pode-se observar que os valores não excederam o limite estipulado pela Portaria N° 2.914/11, em contrapartida, a amostra de água do Ponto 3

(São José do Sabugi) apresentou concentração catorze vezes superior ao permitido. Este resultado confirmou que o poço está em área anômala de NORM, condizendo com o resultado do estudo realizado por Silva (2018). O resultado encontrado no Ponto 3 está acima dos dados reportados na literatura especializada que mostram que a concentração média de urânio em águas subterrâneas no mundo é de 0,1 a 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (WU et al., 2014).

A alta concentração de urânio natural no Ponto 3 pode ser explicada pela formação geológica do município de São José do Sabugi com a presença das rochas graníticas presente na área de estudo, estas rochas possuem relevante concentração de urânio natural. Outros estudos também obtiveram resultados com elevada concentração de urânio natural em águas subterrâneas pela influência das rochas graníticas como Dabous et al. (2002), Warner et al. (2011) e Post et al. (2017).

Estudos mais recentes também demonstraram altas concentrações de urânio natural em águas subterrâneas, dentre eles, estão Krall et al. (2019) que encontraram na Suécia 150  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , Rosen et al. (2019) que encontraram no Vale de San Joaquin na Califórnia-EUA 449  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e Sharma et al. (2019) que encontraram em Punjab na Índia 65,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

#### 4.4 BIOENSAIOS

Os bioensaios foram realizados com águas de três poços residenciais (P1, P2 e P3) e grupo controle negativo (água filtrada e declorada), sendo utilizado também para o ensaio cometa o grupo controle positivo (MMS). Os bioensaios tem como objetivo avaliar os efeitos biológicos provenientes da presença de radionuclídeos naturais utilizando o molusco da espécie *B. glabrata* como bioindicador.

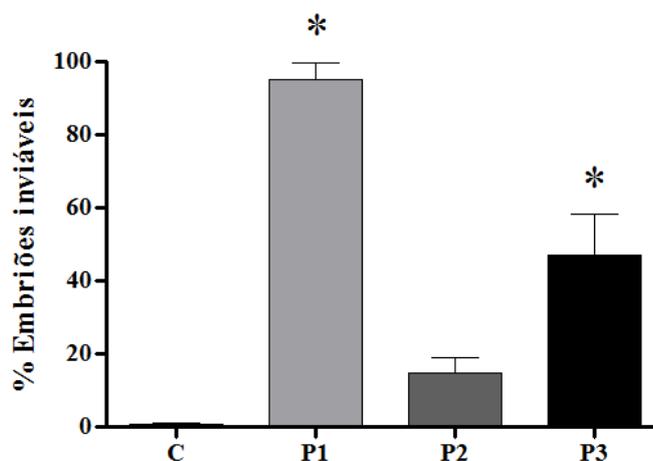
##### 4.4.1 Toxicidade embrionária

Este tópico aborda a toxicidade embrionária encontrada no molusco *B. glabrata*.

###### 4.4.1.1 Análise da embriotoxicidade em *B. glabrata*

A Figura 12 mostra os resultados obtidos após 48 h de exposição dos embriões *B. glabrata* as águas de poços artesianos sob influência de NORM, sendo observada a viabilidade embrionária após decorrido o tempo de exposição. Foram caracterizados embriões inviáveis aqueles que demonstraram mortalidade e má formação embrionária.

Figura 12 - Embriotoxicidade de *B. glabrata* expostos por 48 h às águas subterrâneas.



C = Água filtrada de decolorada; Abreu e Lima = P1 e P2 e São José do Sabugi = P3. \* = diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

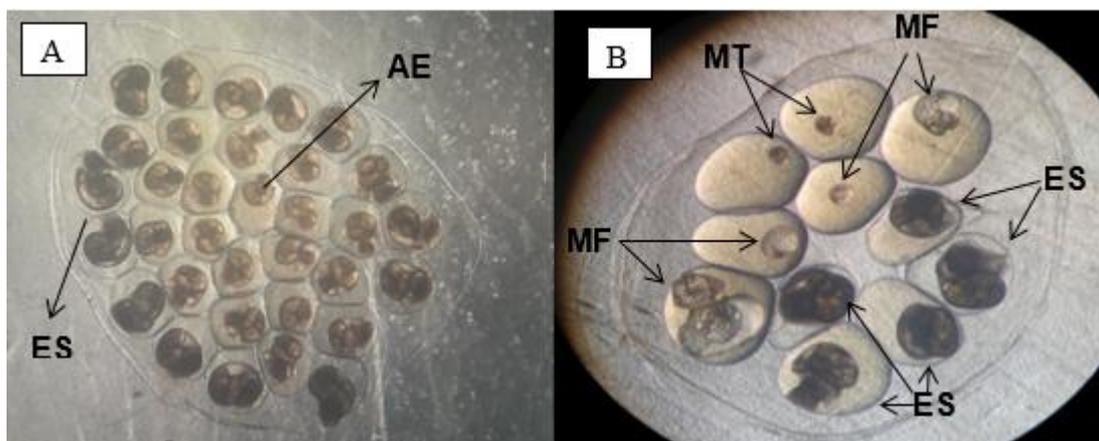
Fonte: O autor, 2020.

Os resultados apresentados demonstram que houve diferença significativa entre os grupos estudados em relação a mortes e malformações embrionárias, com exceção do Ponto 2. O grupo de moluscos expostos à água do poço artesiano localizado em Abreu e Lima (P1) foi o mais embriotóxico, pois apresentou 95% de embriões inviáveis (90,6% de mortalidade e 4,4% de embriões malformados). Esta alta toxicidade pode estar associada à característica química da água do poço, pois o pH da água encontrado foi de 5,2, sendo de caráter ácido. Sabe-se que a sobrevivência dos embriões está diretamente relacionada ao pH da água, sendo considerado ideal para a sobrevivência dos moluscos um pH em torno de 6 a 7 (NEVES, 2005), o que não foi encontrado na amostra, sendo impróprio para a viabilidade dos embriões *B. glabrata*. O Ponto 2 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle com o pH de 6,05. O Ponto 3 apresentou embriotoxicidade de 47% de embriões inviáveis, sendo 3% de mortalidade e 44% de malformados. Sugere-se que esta toxicidade esteja relacionada a presença de urânio na água, visto que o pH (7,08) está de acordo com a viabilidade dos embriões. Além da radiotoxicidade o urânio apresenta toxicidade química, que afeta também outras espécies e que é relatado por meio de estudos reportados por Domingo (2001) que utilizando embriões de ratos obteve resultados de toxicidade química sobre os indivíduos expostos ao urânio resultando em malformações com efeitos teratogênicos e retardo de crescimento. Trabalho realizado por Bourrachot et al. (2008) observaram o efeito do urânio em embriões de *Danio rerio* que demonstrou também ser

sensível, sendo observados efeitos teratogênicos e diminuição do crescimento. Ambos os efeitos da quimiotoxicidade do urânio também foram observados em embriões do *B. glabrata* expostos a água de poço do Ponto 3, sendo constatado predominantemente o efeito de retardo de crescimento na Figura 13 - A.

No âmbito das radiações ionizantes, alguns trabalhos envolvendo embriões de *B. glabrata* foram realizados utilizando fontes de  $^{60}\text{Co}$  com emissão de radiação gama, sendo observados resultados de malformações através de efeitos teratogênicos e retardo de crescimento assim, como mortalidade. Dentre eles, está o de Melo et al. (1996), Okazaki et al. (1996), Tallarico et al. (2004), Siqueira et al. (2014) e Santos et al. (2018). O presente estudo possui relevância científica, pois conduz à resultados da exposição dos embriões de *B. glabrata* a outras fontes de radiações ionizantes provenientes da radiação natural nas águas de poços sob influência NORM. Os efeitos embriotóxicos observados no presente estudo são mostrados na Figura 13 - B.

Figura 13 - Alterações embrionárias encontradas em *B. glabrata*.



**A)** Retardo embrionário predominante no Ponto 3 e **B)** Presença de mortalidade e malformações. Sendo o **ES** = Embriões saudáveis, **MF** = Malformados, **MT** = Mortos e **AE** = Atraso embrionário.

Fonte: O autor, 2020.

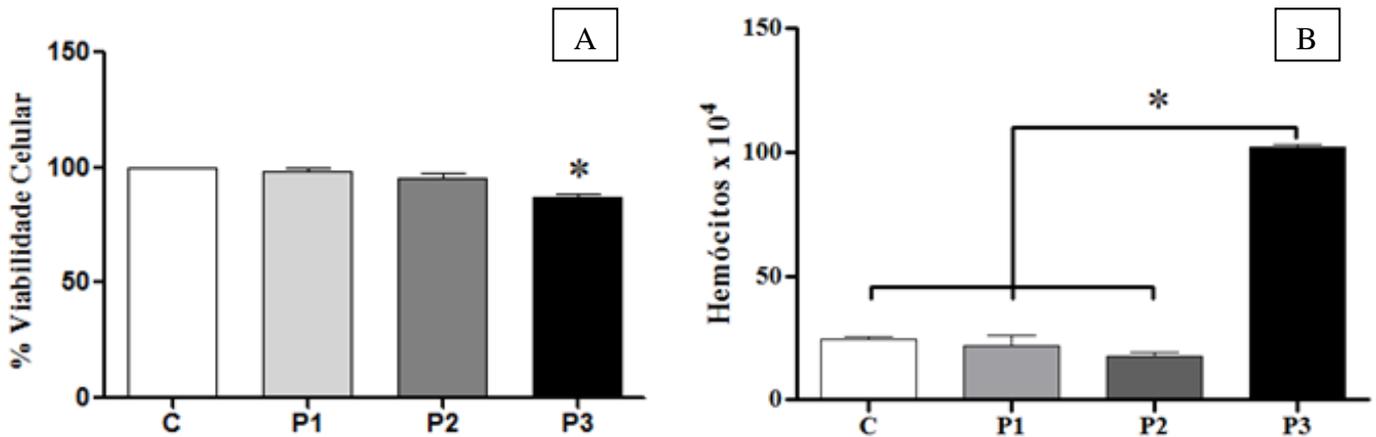
#### 4.4.2 Análise da citotoxicidade em hemócitos de *B. glabrata*

Este tópico aborda os resultados de citotoxicidade provenientes dos experimentos de viabilidade celular e teste do micronúcleo com suas respectivas discussões.

#### 4.4.2.1 Viabilidade celular

Os resultados obtidos no teste de viabilidade celular utilizando o corante Azul de Tripán são mostrados na Figura 14.

Figura 14 - Viabilidade celular (A) e número de hemócitos totais (B).



C = Água filtrada e decolorada; Abreu e Lima = P1 e P2 e São José do Sabugi = P3. \* = diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados acima (Figura 14 - A), demonstram que as frequências médias de viabilidade celular foram de 99,5% para o grupo controle; 98,52% para o Ponto 1; 95,01% para o Ponto 2 e 87,37% para o Ponto 3 com diferença significativa em relação ao grupo controle. Segundo o protocolo internacional para testes citotóxicos criado pela ISO 10993-5:2009 (ISO, 2009), os ensaios que apresentem células viáveis abaixo de 70% são considerados significativamente citotóxicos. Portanto, de acordo com este protocolo os resultados encontrados neste estudo não apresentaram efeitos citotóxicos demonstrando alta viabilidade celular.

Na Figura 14 - B foi observado um expressivo aumento no número de hemócitos dos caramujos expostos à água subterrânea no Ponto 3. Sugere-se que o aumento do número de hemócitos está diretamente relacionado com a resposta imunológica do bioindicador. Os hemócitos são responsáveis pelo mecanismo de defesa do molusco, onde a resposta deste organismo pode estar relacionada à presença elevada de urânio na amostra da água do Ponto 3. Poucos estudos foram realizados para o entendimento dos agentes que causam o aumento do número de hemócitos, dentre eles, destaca-se o trabalho de Stumpf e Gilbertson (1978) que

observaram que à idade, temperatura e infecção por *S. mansoni* podem aumentar o número de hemócitos.

No âmbito das radiações ionizantes, o estudo realizado por Bezerra et al. (2003) expôs caramujos da espécie *B. tenagophila* à radiação gama (fonte de  $^{60}\text{Co}$ ) obteve resultados que demonstraram a radioresistência dos hemócitos irradiados, não diminuindo seus números significativamente após irradiação. Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Silva et al. (2017) em que foi observado que os moluscos irradiados com  $^{60}\text{Co}$  apresentaram um aumento do número de hemócitos com a elevação da dose de radiação, ou seja, houve um comportamento dose-dependente. Este comportamento também foi observado por Silva et al. (2013) que registraram um aumento no número de hemócitos na maior dose (55 Gy) de radiação gama utilizada. Ambos os trabalhos demonstraram relação entre radiação ionizante e o número de hemócitos, algo verificado neste estudo. Não há registros na literatura sobre a utilização da técnica de viabilidade celular em *B. glabrata*, expostos às águas subterrâneas ricas em urânio e radônio, portanto, os resultados encontrados neste trabalho são pioneiros. A análise da viabilidade celular e do número de hemócitos possibilitou o uso de outras técnicas ecotoxicológicas como o teste do micronúcleo e cometa, dados apresentados nos próximos subtópicos.

#### 4.4.2.2 Análise do teste do micronúcleo

Na Tabela 7 é possível verificar a análise das alterações dos hemócitos dos moluscos *B. glabrata* expostos às águas dos poços de Abreu e Lima (Ponto 1 e 2) e São José do Sabugi (Ponto 3).

Tabela 7 - Número total de alterações observadas no teste do micronúcleo.

<b>Grupos</b>	<b>Micronúcleo</b>	<b>Binucleação celular</b>	<b>Apoptose</b>
<b>Controle</b>	1	4	0
<b>Ponto 1</b>	3	3	3
<b>Ponto 2</b>	1	4	0
<b>Ponto 3</b>	2	7	2

Controle = Água filtrada e declorada; Abreu e Lima = Ponto 1 e 2 e São José do Sabugi = Ponto 3.

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados demonstraram que a binucleação celular foi a alteração mais frequente entre os hemócitos dos moluscos expostos a águas dos poços, sendo a amostra do Ponto 3 a que apresentou o nível mais elevado de células binucleadas. No entanto, percebeu-se que este teste não foi suficientemente sensível para detectar alterações citotóxicas da exposição ao radônio e ao urânio. A literatura é escassa em estudos que envolvam as radiações ionizantes e os hemócitos de *B. glabrata*, trabalhos com radiação gama e hemócitos demonstraram alterações celulares significantes após irradiação de  $^{60}\text{Co}$ , dentre eles, está o de Araújo et al. (2011), Silva et al. (2013) e Silva et al. (2017). Isto ressalta a importância deste presente trabalho, pois traz para a literatura mais um estudo com a utilização de hemócitos de *B. glabrata* expostos à radiação ionizante e as observações hemocitárias encontradas.

Pesquisas com outras espécies de moluscos submetidos à radiação ionizante demonstraram alterações na frequência de micronúcleo como o estudo de Jaeschke et al. (2015) que utilizaram a mesma espécie, após 70h de exposição à água radioativa contendo urânio,  $^{90}\text{Sr}$  e  $^{137}\text{Cs}$  observaram elevadas frequências de micronúcleos corroborando com o experimento de 2011 demonstrando maior quantidade de micronúcleo em exposição aguda.

Alguns estudos utilizando outras espécies de moluscos frente às radiações ionizantes não observaram resultados significativos utilizando o teste do micronúcleo, algo verificado no presente trabalho. Dentre eles, está o de Falfushynska et al. (2016) que irradiaram a espécie *Anodonta anatina* com 2 mGy de raio-x e obteve como resultado em um dos grupos estudados baixas frequência de micronúcleos, binucleação celular e apoptose. Gudkov et al. (2016) que analisaram amostras de lagos radioativos em torno do território do acidente de Chernobyl contendo como radionuclídeos predominantes  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{238}\text{Pu}$ ,  $^{239}\text{Pu}$ ,  $^{240}\text{Pu}$  e  $^{241}\text{Am}$ , sendo utilizada a espécie *Lymnaea stagnalis* onde foi observado como resultado um aumento no número de células e poucas alterações celulares, algo também constatado no presente estudo com aumento celular no Ponto 3.

Por fim, o molusco *B. glabrata* não demonstrou ser suscetível quando expostos às águas de poços estudadas por meio da utilização do teste do micronúcleo, sendo necessário utilizar um ensaio mais sensível como o ensaio cometa.

#### 4.4.2.3 Ensaio cometa

A hemolinfa do molusco *B. glabrata* foi utilizada para realização do ensaio cometa, para avaliação do efeito biológico das diferentes amostras das águas de poços artesianos, sobre o DNA. Por meio da análise dos resultados obtidos, verificou-se que o ensaio permitiu

determinar a existência de danos no DNA dos moluscos induzidos pelas águas subterrâneas sob influência de NORM. Estes resultados encontram-se apresentados na Tabela 8 e Figura 15.

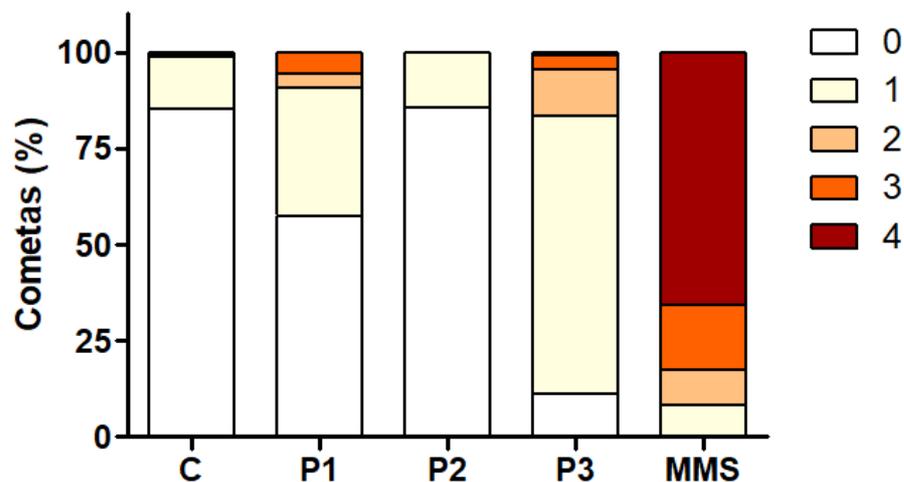
Tabela 8 - Análise do dano genético em hemócitos de *B. glabrata* expostos às águas de poços.

Exposição	Índice de Dano (Unid. Arbitrárias) <sup>a</sup>	Frequência de dano (%) <sup>a</sup>
C	16,75 ± 3,86	14,75 ± 3,10
P1	57,5 ± 5,26*	42,5 ± 12,9*
P2	14,33 ± 3,06	14,33 ± 3,06
P3	111,00 ± 4,55*	89,00 ± 5,89*
MMS	339,67 ± 32,01*	99,67 ± 0,58*

<sup>a</sup>Média dos valores e desvio padrão obtidos a partir da contagem de 100 células por replicata, experimento realizado em triplicata. C = grupo controle negativo; P1 = Abreu e Lima; P2 = Abreu e Lima; P3 = São José do Sabugi e MMS = Grupo controle positivo. \* = diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

Fonte: O autor, 2020.

Figura 15 - Graus de cometa encontrados.



C = Controle negativo; Abreu e Lima = P1 e P2; São José do Sabugi = P3 e MMS = Controle positivo.

Fonte: Autor, 2020

Os resultados expostos acima apresentam diferenças significativas quando correlacionados aos danos de DNA dos hemócitos, sendo os Pontos 1 e 3 os mais relevantes. De acordo com a Tabela 8, o índice de danos encontrados foram de 57,5 e 111 para os Pontos 1 e 3, respectivamente. As frequências de danos encontradas foram de 42,5 e 89% para os Pontos 1 e 3, respectivamente. A Figura 15 demonstra a presença de graus 1, 2 e 3, sendo

encontrados graus 4 no Ponto 3. A água de poço do Ponto 1 apresentou genotoxicidade significativa, porém, a concentração de radônio na amostra ( $79,35 \text{ Bq/L}^{-1}$ ) foi inferior ao encontrado no Ponto 2 ( $206,13 \text{ Bq/L}^{-1}$ ). Este fato nos leva a acreditar que a alteração no DNA causada no Ponto 1 pode estar associada a presença do urânio ( $4,21 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e não com a concentração do radônio. Segundo Silva e Bonotto (2015), concentrações de urânio em água subterrâneas acima de  $4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  podem ser consideradas anômalas dependendo do contexto geológico local. O Ponto 3 foi o que obteve o dano mais significativo devido à forte presença do urânio natural ( $444,39 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) nesta água de poço. Segundo Valente et al. (2017), o ensaio cometa é o mais sensível utilizado na avaliação da genotoxicidade, sendo possível detectar danos diretos no DNA sem esperar o sistema de reparo e divisão celular para análise de micronúcleos com posterior comprovação de danos biológicos. Tais efeitos deletérios foram identificados no presente estudo, caracterizados por uma baixa quantidade de alterações morfológicas observadas no teste do micronúcleo, bem como, alterações no DNA detectados por meio do ensaio cometa. O ensaio cometa para a espécie *B. glabrata* foi padronizado por meio de irradiação com uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ , onde mostrou ser um teste sensível e eficiente na avaliação da genotoxicidade proveniente das radiações ionizantes (GRAZEFFE et al., 2008), resultado que corrobora os achados deste estudo.

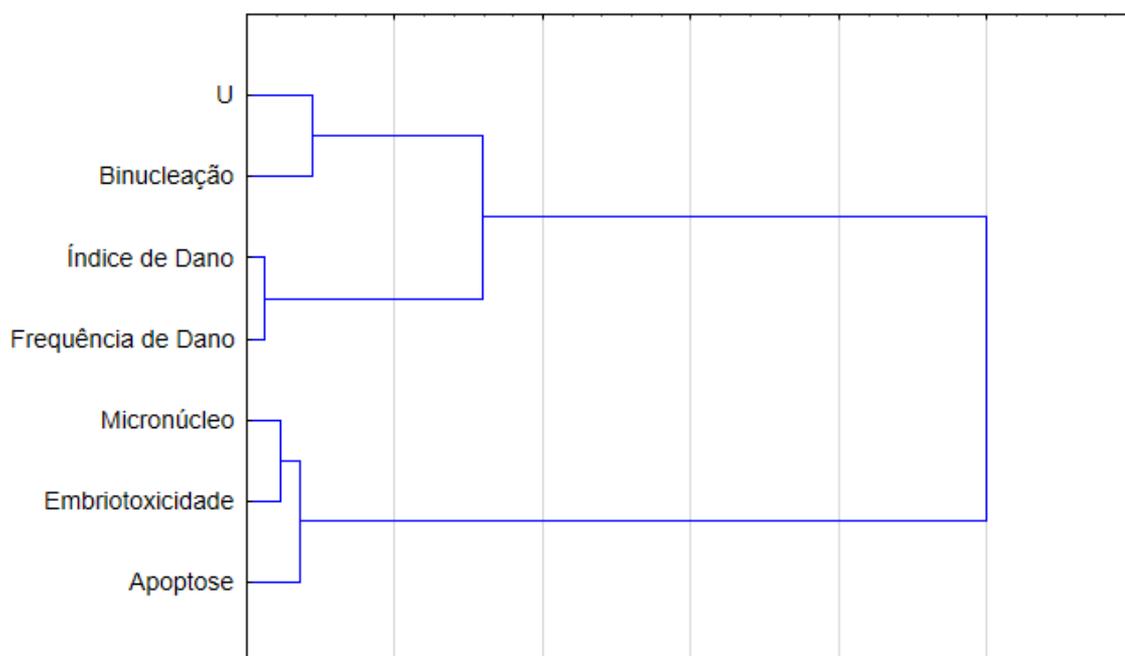
Outras espécies de moluscos foram estudadas utilizando o ensaio cometa acerca das radiações ionizantes como foi demonstrado por Jha et al. (2005), que utilizaram a espécie *Mytilus edulis* exposta à água radioativa contendo trítio ( $^3\text{H}$ ) com doses de 12 a  $485 \text{ } \mu\text{Gy}$ , em que foram observadas frequências de danos significativas de até 30%. AlAmri et al. (2012) utilizaram a espécie *M. edulis* exposta à água radioativa concentrada de  $^{90}\text{Sr}$ , isótopos de Pu,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{241}\text{Am}$ ,  $^{40}\text{K}$  e  $^{238}\text{U}$ , onde foi observada diferença significativa com elevada frequência de dano (60%). Kumar et al. (2014) utilizaram duas espécies *Paphia malabarica* e *Meretrix casta* expostas à radiação gama com 2 a 10 Gy por 24, 48 e 72 h. Analisando os tempos de exposições, as duas espécies obtiveram frequências de danos de 50% e 60% na menor e maior dose, respectivamente.

#### 4.5 AGRUPAMENTO DOS DADOS RADIOMÉTRICOS E BIOENSAIOS

Foi realizado um agrupamento de dados por meio da construção de um dendrograma (Figura 16) utilizando o método de ligação de Ward's, sendo possível relacionar os achados radiométricos dos pontos de coleta com os bioensaios através do programa Statistica 10. Esta análise de agrupamento leva em consideração os vetores das médias dos dados analisados,

permitindo encontrar similaridades entre os resultados de um mesmo grupo ou entre eles, assim como, a distância baseada nas diferenças entre os dados de um grupo para o outro. Não foi possível estabelecer semelhanças de dados do  $^{232}\text{Th}$  e  $^{226}\text{Ra}$  com os bioensaios, pois eles estavam a baixo do limite de detecção. Quanto ao  $^{222}\text{Rn}$ , foi verificado durante a discussão deste trabalho que este elemento não influenciou em nenhum resultado dos bioensaios, sendo portanto, não relacionado no agrupamento de dados do dendrograma.

Figure 16 - Dendrograma sintetizando o agrupamento de dados de acordo com sua semelhança.



Fonte: Autor, 2020.

De acordo com a distribuição dos grupos estudados e apresentados pelo dendrograma, foi identificada similaridade de dados entre o urânio e a binucleação celular. Esta similaridade pode ser explicada por meio dos resultados encontrados nos pontos P1 e P2, apresentando baixos achados de binucleação celular e baixa concentração de urânio. Foi possível também identificar resultados próximos entre o urânio e o ensaio cometa por meio do achado no ponto P3 que apresentou alta concentração deste elemento influenciando nos resultados do ensaio cometa.

Em relação ao outro agrupamento de dados, foi possível encontrar similaridade de resultados entre o teste do micronúcleo, embriotoxicidade e apoptose. Esta similaridade pode ser explicada por meio dos achados do P2, visto que, foi encontrada baixa concentração de urânio neste ponto de coleta, assim como, baixos achados nos três bioensaios. Ressaltando

que a alta embriotoxicidade encontrada no P1 está relacionada ao pH amostral, tendo o urânio exercido baixa influência neste ponto de coleta.

Por fim, fica evidente por meio da análise do dendrograma a influência que o  $^{238}\text{U}$  exerceu nos bioensaios, sendo diferenciado de acordo com as concentrações encontradas nos pontos amostrais.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das informações obtidas fica esclarecida a utilização do molusco *Biomphalaria glabrata* como bioindicador de águas de poços influenciadas por NORM, onde demonstrou ser um bioindicador sensível à presença do urânio natural reportando sensibilidade embrionária e genotóxica. As conclusões dos objetivos específicos elucidados nesta pesquisa são mostradas a seguir:

- a) Os parâmetros radiométricos identificados ultrapassaram o limite recomendado pela USEPA, sendo observadas elevadas concentrações de  $^{222}\text{Rn}$  em todas as águas dos poços estudadas com baixa concentração de  $^{226}\text{Ra}$ . Demonstrando a segurança na escolha dos pontos de coleta em analisar águas de poços que ainda são influenciadas por NORM, baseando-se em estudos prévios;
- b) A análise radiométrica por meio da identificação de metais pesados demonstrou baixas concentrações de  $^{232}\text{Th}$  e elevada concentração de  $^{238}\text{U}$  na água subterrânea do Ponto 3, ultrapassando o limite estabelecido pela Portaria Nº 2.914/11 do Ministério da Saúde;
- c) Foi observado efeito embriotóxico significativo das amostras de águas dos Pontos 1 e 3 demonstrando sensibilidade embrionária do molusco *B. glabrata* quanto à modificação do pH e presença de  $^{238}\text{U}$ , respectivamente;
- d) A genotoxicidade no DNA dos hemócitos de *B. glabrata* mostrou-se significativa nas amostras de águas dos Pontos 1 e 3 quanto a presença de  $^{238}\text{U}$ ;
- e) A avaliação de citotoxicidade e das alterações celulares não apresentaram alterações significativas;
- f) As diferentes concentrações de urânio natural encontradas nas amostras exerceram forte influência desse elemento nos bioensaios por meio do estudo utilizando dendrograma.

Este estudo possui relevância científica, pois traz para a literatura especializada o uso de *B. glabrata* como bioindicador de água subterrânea com influência de NORM, assim como, a comprovação da presença dos radionuclídeos naturais  $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{232}\text{Th}$  e  $^{238}\text{U}$  nas águas de poços estudadas o que representa risco à saúde das populações que as usufruem.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, P. D. Water pollution biology. **CRC Press**, 2014.
- ABDUL-SALAM, J. M.; MICHELSON, E. H. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes: effect of *Schistosoma mansoni* infection on in vitro phagocytosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 35, n. 3, p. 241-248, 1980.
- ADAMS, W. J. et al. In: Handbook of Ecotoxicology. **Lewis Publishers**, ed. 2, cap. 2, Boca Raton, Flórida, 2003.
- ALAMRI, O. D. et al. Ionizing radiation-induced DNA damage response identified in marine mussels, *Mytilus* sp. **Environmental pollution**, v. 168, p. 107-112, 2012.
- ALIYU, A. S.; RAMLI, A. T. The world's high background natural radiation areas (HBNRAs) revisited: A broad overview of the dosimetric, epidemiological and radiobiological issues. **Radiation Measurements**, v. 73, p. 51-59, 2015.
- AL-AMIR, S. M. et al. Natural radioactivity in tap water and associated age-dependent dose and lifetime risk assessment in Amman, Jordan. **Applied radiation and isotopes**, v. 70, n. 4, p. 692-698, 2012.
- ALMEIDA, M. G. **Estudo para o aproveitamento do urânio como sub produto da fosforita do Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado) - USP, São Paulo, 1978.
- ALMEIDA, R. M. R. et al. Groundwater radon, radium and uranium concentrations in Região dos Lagos, Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of environmental radioactivity**, v. 73, n. 3, p. 323-334, 2004.
- AMARAL, R. S. **Dose na população da região urano-fosfática Pernambucana, devida a presença de urânio e <sup>226</sup>Ra nos cultivares**. Tese de Doutorado, IPEN/CNEN-USP, São Paulo, p. 141, 1994.
- AMARAL, R. S. et al. Evaluation of <sup>226</sup>, <sup>228</sup>-Ra Levels from Public Drinking Water Supplies in the Area of Great Recife, Brazil. In: **11th International Congress of the International Radiation Protection Association**, Madrid, 2004.
- AMARAL, D. S. et al. Radônio-222 em águas de poços em áreas do fosforito uranífero da região metropolitana do Recife/Radon-222 in well water in areas of the uraniferous phosphite of the Recife metropolitan region. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3920-3926, 2019.
- AMEN, R. I. et al. Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. **Parasitology**, v. 104, n. 1, p. 33-40, 1992.
- ANDRADE JÚNIOR et al. Ajustes hematológicos em tambaqui (*Colossoma macropomum curvier*, 1818) exposto a diferentes concentrações de chorume. **Revista Colombiana de Ciência Animal**, v. 5, n. 1, p. 71-82, 2013.

ANDREWS, J. N. et al. Natural radioelement solution by circulating groundwaters in the Stripa granite. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 53, n. 8, p. 1791-1802, 1989.

ANNANGI, B. et al. Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 140-161, 2016.

ARALDI, R. P. et al. Análise do potencial mutagênico dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA) e da L-carnitina mediante o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, p. 448-451, 2013.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

ARAÚJO, E. F. et al. Use of micronucleus test in the assessment of radiation effects in aquatic environments. **International Nuclear Atlantic Conference – INAC**, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2011.

ARAÚJO, E. E. N. et al. Dosimetry of radium equivalent in construction material of brick works in São José do Sabugi City-Paraíba, Brazil. **International Nuclear Atlantic Conference – INAC**, São Paulo - SP, Brazil, 2015.

ARAÚJO, H. D. A. et al. Dataset on schistosomiasis control using potassium usnate against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stage and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Data in brief**, v. 21, p. 1347-1351, 2018.

ASIC, A. et al. Chemical toxicity and radioactivity of depleted uranium: the evidence from in vivo and in vitro studies. **Environmental research**, v. 156, p. 665-673, 2017.

ASTM, Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: **American Public Health Association**, 20<sup>a</sup> ed., 1998.

BANDOW, C.; WELTJE, L. Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. **Science of the total environment**, v. 435, p. 90–95, 2012.

BAGLIANO, R. V. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 2, n. 1, p. 24-40, 2012.

BAIRD, C. Química Ambiental – **Bookman**, 2<sup>o</sup> Ed. Porto Alegre, p. 622, 2002.

BARRACCO, M. A. et al. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenapophila*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 73-83, 1993.

BARBOSA, F. S. Tópicos em malacologia médica. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, p. 314, 1995.

BAYNE, C. J. et al. *Schistosoma mansoni*: cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 409-416, 1980.

BEZERRA, F. S. M. et al. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant *Biomphalaria tenagophila* snails. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 73-75, 2003.

BICKHAM, J. W.; SANDHU, S.; HEBERT, P. D.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v. 463, p. 33-51, 2000.

BIRK, S. et al. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. **Ecological Indicators**, v. 18, p. 31-41, 2012.

BISWAS, A. et al. Role of competing ions in the mobilization of arsenic in groundwater of Bengal Basin: Insight from surface complexation modeling. **Water Research**, v.55, p.30-39, 2014.

BIZZI, L. A. Geologia, Tectônica e Recursos Minerais do Brasil. Brasília: CPRM – **Serviço Geológico do Brasil**, p. 692, 2003.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.

BONOTTO, D. M.; MELLO, C. B. A combined method for evaluating radon and progeny in waters and its use at Guarani aquifer, São Paulo State, Brazil. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 86, p. 337-353, 2006.

BOURRACHOT, S. et al. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, v. 90, n. 1, p. 29-36, 2008.

BOWEN, J. M. H. Environmental Chemistry of the Elements. London, **Academies Press**, p. 273, 1979.

BRANCO, S. M. A. Água e o Homem. In: Porto, L.R., org. **Hidrologia ambiental**. São Paulo. EPUSP/ABRH, p. 3 – 25.1991.

BUGGE, J.; WEBER, R. Oxygen binding and its allosteric control in hemoglobina of the pulmonate snail, *Biomphalaria glabrata*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, p. 347-356, 1999.

CANTINHA, R. S. **Influência da radiação gama de alta taxa de dose na sobrevivência e na reprodução de *Biomphalaria glabrata***. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares). Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

CANTINHA, R. S. et al. Effects of High dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. **International Journal of Low Radiation**, v. 4, p. 245-251, 2010.

CANU, I. G. et al. Health effects of naturally radioactive water ingestion: the need for enhanced studies. **Environmental health perspectives**, v. 119, n. 12, p. 1676-1680, 2011.

CAREW, M. E. et al. Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. **Frontiers in zoology**, v. 10, n. 1, p. 45, 2013.

CAVALCANTI, M. G. S. et al. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micro**, v. 43, p. 285-291, 2012.

CNEN – Comissão Nacional de Energia nuclear. DIRETRIZES BÁSICAS DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA. 2014. Disponível em: “<http://appasp.cnem.gov.br/seguranca/normas/pdf/Nrm301.pdf>” Acessado em: 15/01/2020.

CHENG, T. C. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. Review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 266, p. 343 – 379, 1975.

CHENG, T. C.; GARRABRANT, T. A. Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. **International journal for parasitology**, v. 7, p. 467-472, 1977.

CHENG, T. C.; AULD, K. R. Hemocytes of the pulmonate Gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 30, p. 119 – 122, 1997.

CHYI, L. L. **Radon testing of varius countertop materials final report**. The University of Akron, Department of Geology and Environmental Science, Ohio, United States, 2008.

COLLINS, A. R. et al. The Comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151.2008.

COLLINS, A. et al. Sensitive detection of DNA oxidation damage induced by nanomaterials. **Free Radical Biology and Medicine**, 2017.

COONEY, J. D. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. Washington (DC): **Taylor & Francis**. Chapter 2. Freshwater tests; p. 71–102. 1995.

CORRÊA, J. N. et al. Monitoramento da radioatividade alfa relacionada ao radônio-222 em águas de poços da região metropolitana de Curitiba (PR). **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 20, n. 2, p. 243 – 250, 2015.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação – **Revista Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CPRM. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, estado de Pernambuco: **diagnóstico do município de Abreu e Lima**, 2005a.

CPRM. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, estado da Paraíba: **diagnóstico do município de São José do Sabugi**, 2005b.

CUNHA, L. M. R. **Ecotoxicologia e a qualidade da água para o uso na agricultura**. Trabalho Conclusão de Curso (Graduação), Gestão do Agronegócio, Universidade de Brasília, Planaltina, 2011.

DABOUS, A. A. et al. Uranium/Thorium isotope evidence for ground-water history in the Eastern Desert of Egypt. **Journal of arid environments**, v. 50, n. 2, p. 343-357, 2002.

DARKO, G. et al. Assessment of the activity of radionuclides and radiological impacts of consuming underground water in Kumasi, Ghana. **Environmental earth sciences**, v. 73, n. 1, p. 399-404, 2015.

DIOP, C. et al. Assessment of contamination, distribution and chemical speciation of trace metals in water column in the Dakar coast and the Saint Louis estuary from Senegal, West Africa. **Marine pollution bulletin**, v. 86, n. 1-2, p. 539-546, 2014.

DOMINGO, J. L. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 6, p.603-609, 2001.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações** [Aquatic ecotoxicology: principles and applications]. São Carlos: Rima. Chapter 7, Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos; p. 153–183. 2006.

DORNFELD, C.B. **Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2002.

DUARTE, P. J. Depósitos de fosfatos na formação Maria Farinha. **An. Soe. Biol. Pernambuco**, v. 9, n. 1, 1949.

DUARTE, G. F. **Viabilidade de massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata* em filme de água e susceptibilidade a *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana***. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p. 61, 2014.

EDELSTEIN, M.; BEN-HUR, M. Heavy metals and metalloids: Sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 234, p. 431-444, 2018.

EISENBUD, M. D.; GESELL, T. Environmental radioactivity: from natural, industrial and military sources. New York, **Academic Press**, p. 656, 1997.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. EURACHEM / CITAC Guide CG 4: Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3<sup>o</sup> Edition, p. 4-121. 2012

EL-MAGEED, A. I. A. et al. Natural radioactivity of ground and hot spring water in some areas in Yemen. **Desalination**, v. 321, p. 28-31, 2013.

ERÖSS, A. et al. Uranium in groundwater—The importance of hydraulic regime and groundwater flow system understands. **Journal of environmental radioactivity**, v. 195, p. 90-96, 2018.

ESTEVAM, E. C. et al. Dominant lethal effects of 2,4-D in *Biomphalaria glabrata*. **Mutation Research**, v. 611, p. 83-88, 2006.

FALFUSHYNSKA, H., et al. Interpopulational variability of molecular responses to ionizing radiation in freshwater bivalves *Anodonta anatina* (Unionidae). **Science of the Total Environment**, v. 568, p. 444-456, 2016.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FERREIRA, M. V. R. et al. Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in the fresh water snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Canadian Journal of Zoology**, v. 81, p. 1239-1248, 2003.

FIANCO, A. C. B. **Concentrações de radônio nas águas subterrâneas, rochas e solos de Porto Alegre – RS**. Dissertação de mestrado. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 99 p. 2011.

FLEISCHER, R. L.; RAABE, O. G. Recoiling alpha-emitting nuclei. Mechanisms for uranium-series disequilibrium. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 42, n. 7, p. 973-978, 1978.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FRIBERG, N et al. Biomonitoring of human impacts in freshwater ecosystems: the good, the bad and the ugly. **Advances in Ecological Research**, v. 44, p.1–68, 2011.

GAVIOLI, Y. et al. Emissão de radônio em rochas ornamentais. **In: Anais do XXII Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa**. Rio Grande do Sul, Gramado, v. 2, p. 767-777. 2009.

GOLDSTEIN, E. G. et al. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos**. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), São Paulo, 1990.

GOUGET, B. Uranium: Toxicity to Renal Cells and Osteoblasts. **Encyclopedia of Environmental Health**, 2º Ed., p.259-265, 2019.

GRAZEFTE, V. S. et al. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 654, p. 58-63, 2008.

GRIVICICH, I. et al. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUDKOV, D. I. et al. Radiation-induced cytogenetic and hematologic effects on aquatic biota within the Chernobyl exclusion zone. **Journal of environmental radioactivity**, v. 151, p. 438-448, 2016.

HANSON, M.L. et al. How we can make ecotoxicology more valuable to environmental protection. **Science of The Total Environment**, v. 578, p. 228-235, 2017.

HARTON, G. L.; TEMPEST, H. G. Chromosomal disorders and male infertility. **Asian journal of andrology**, v. 14, n. 1, p. 32, 2012.

HASAN, A. B. et al. Trace metals pollution in seawater and groundwater in the ship breaking area of Sitakund Upazilla, Chittagong, Bangladesh. **Marine pollution bulletin**, v. 71, n. 1-2, p. 317-324, 2013.

HAWKES, J. S. Heavy metals. **Journal of Chemical Education**, v. 74, p. 1369-1374, 1997.

HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

HETMAN, A. et al. Determination of radium isotopes concentrations in mineral waters by liquid scintillation method. **Nukleonika**, v. 43, n. 4, p. 481-488, 1998.

HEUSER, V. D. et al. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell biology international**, v. 32, n. 10, p. 1223-1229, 2008.

HINTZSCHE, H. et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation research**, v. 771, p. 85, 2017.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico**. Acessado em 29 de Agosto de 2018.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos, nº DOQ-CGCRE-008. 2011.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity**. 3º Ed, ISO, p. 34, 2009.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons**. 2º Ed, ISO, p.89, 2015.

IWANAGA, S. The limulus clotting reaction. **Current opinion in Immunology**, v. 5, p. 74-82, 1993.

JACOMINO, V. F. et al. Estimates of cancer mortality due to the ingestion of mineral spring waters from a highly natural radioactive region of Brazil. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 33, n. 3, p. 319 – 329, 1996.

JAESCHKE, B. C. et al. Retention of radioactive particles and associated effects in the filter-feeding marine mollusc *Mytilus edulis*. **Science of the Total Environment**, v. 502, p. 1-7, 2015.

JHA, A. N. et al. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 586, n. 1, p. 47-57, 2005.

JIA, G.; JIA, J. Determination of radium isotopes in environmental samples by gamma spectrometry, liquid scintillation counting and alpha spectrometry: a review of analytical methodology. **Journal of environmental radioactivity**, v. 106, p. 98-119, 2012.

JIA, G. et al. Determination of radium isotopes in soil samples by alpha-spectrometry. **Journal of radioanalytical and nuclear chemistry**, v. 273, n. 3, p. 779-783, 2007.

JURBERG, P. et al. Behavior of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda: Planorbidae) - I. Morphophysiology of the mantle cavity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 287-295, 1997.

KAWANO, T. et al. The principal stages of the embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae): Pratical guide. **Malacologia**, v. 34, p. 33-40, 1992.

KAWANO, T. et al. Estudo do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações. In: CARVALHO, O. S. (Org.). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2008.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D' Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). I – Duração do período embrionário. **Revista de Saúde Pública**, v. 10, p. 57-64, 1976.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D' Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). II – Fecundidade e fertilidade. **Revista Saúde Pública**, n. 11, p. 47-64, 1977.

KENDALL, R. J. et al. Aquatic and terrestrial ecotoxicology, Toxicology the Basic Science of Poisons. **Mac Graw-Hill**: New York, p. 883-905, 1996.

KENDALL, R. J. et al. In: Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons, **MacGraw-Hill**, New York, Ed. 6, cap. 26, 2001.

KHAYET, M.; MATSUURA, T. Radioactive decontamination of water. **Desalination**, n. 321, p. 1-2, 2013.

KIGOSHI, K. Alpha recoil  $^{234}\text{Th}$ : Dissolution in water and the  $^{234}\text{U}/^{238}\text{U}$  disequilibrium innature. **Science**, v. 173, p. 47–48, 1971.

KNAAP, V. W. P. W.; LOKER, E. S. Immune mechanism in trematode-snail interaction. **Parasitology Today**, v. 6, p.175 – 182, 1990.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. 20° Ed. Florianópolis: **Gráfica Coan**, 2005.

KRALL, L. et al. Radium isotopes to trace uranium redox anomalies in anoxic groundwater. **Chemical Geology**, p. 119296, 2019.

KUMAR, A. et al. Thorium-induced neuro behavioural and neurochemical alterations in Swiss mice. **International journal of radiation biology**, v. 85, n. 4, p. 338-347, 2009.

KUMAR, A. et al. Understanding the biological effects of thorium and developing efficient strategies for its decorporation and mitigation. **Barc Newsletter**, v. 335, p. 55-60, 2013.

KUMAR, M. K. P. et al. Evaluation of  $\gamma$ -radiation-induced DNA damage in two species of bivalves and their relative sensitivity using comet assay. **Aquatic toxicology**, v. 150, p. 1-8, 2014.

LAMONTAGNE, S. et al. Radium and radon radioisotopes in regional groundwater, intertidal groundwater, and seawater in the Adelaide Coastal Waters Study area: implications for the evaluation of submarine groundwater discharge. **Marine Chemistry**, v. 109, n. 3-4, p. 318-336, 2008.

LAURIA, D. C. et al. Ocorrência de radônio, de rádio e de chumbo-210 em águas subterrâneas nas cercanias de Goiânia. **Águas Subterrâneas**, n. 1, 2004.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 1, p. 43-64, 2003.

LIMA, R. A. **Avaliação da dose na população da região urano-fosfática do Nordeste que utiliza os recursos hídricos da região**. Tese de Doutorado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares(IPEN). Universidade de São Paulo, São Paulo, p.178, 1996.

LIMA, M. V. et al. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 4, p. 3350-3356, 2019.

LINSALATA, P. Exposure to long-lived members of the uranium and thorium decay chains. **International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 241-250, 1989.

- LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. **Methods in Molecular Biology**, v. 740, p. 7-12, 2011.
- LUZHNA, L. et al. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in genetics**, v. 4, p. 131-131, 2013.
- MA, Y. et al. Toxicity of cerium and thorium on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 134, p. 226-232, 2016.
- MAFRA, K. C. **Medidas da concentração de Radônio-222 em água de poço e solo da região do Pinheirinho em Curitiba e proposta de mitigação da água**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2011.
- MAGALHÃES, D. P. et al. A ecotoxicologia como Ferramenta de Biomonitoramento de Ecossistemas aquáticos – **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.12, n.3, 355-381, 2008.
- MAHONEY, J. J. et al. Adsorption of Sr on kaolinite, illite and montmorillonite at high ionic strengths. **Radiochimica Acta**, v. 54, n. 3, p. 139-144, 1991.
- MALEK, E. A. Factors conditioning the habitat of bilharziasis intermediate hosts of the family Planorbidae. **Bulletin of the World Health Organization**, n. 18, p. 785-818, 1958.
- MANOEL FILHO, J. Exploração de água subterrânea em zona urbana: caso da grande Recife-PE. **Águas Subterrâneas**, n. 1, 2004.
- MAZZILLI, B. P. et al. Radioatividade no meio ambiente e avaliação de impacto radiológico ambiental. **IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), Universidade de São Paulo, São Paulo**, p. 92, 2011.
- MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology letters**, v. 99, n. 3, p. 157-168, 1998.
- MCLAUGHLIN, J. L. et al. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. **RevSocVenez Quim**, v. 18, n. 1, p. 13-18, 1995.
- MEDLEY, P. et al.  $^{228}\text{Ra}$  and  $^{226}\text{Ra}$  measurement on a  $\text{BaSO}_4$  co-precipitation source. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 96, p. 200 - 207, 2015.
- MEHARI, A. K. et al. Spatial and seasonal variation in the macro-invertebrates and physico-chemical parameters of the Enfranz River, Lake Tana sub-basin (Ethiopia). **Ecology & Hydrobiology**, v. 14, p. 304–312, 2014.
- MELO, A. M. M. A. et al. Study of  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) embryos. **Journal of Medical and Applied Malacology**, v. 8, p. 140-141, 1996.
- MELO, A. M. M. A. et al. DL50 of  $^{60}\text{Co}$  gamma rays applied on *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). **Bulletin Of The Institute Of Malacology**, Japão, v. 3, n.8, p. 125-130, 2001.
- MELO, P. D. S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 36, n. 8, p. 539-543, 2000.

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 e Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 569-578. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas. **Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**, Distrito Federal, Brasília, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (VIGIAGUA)**. Portaria N° 2.914, Publicada em 12 de Março de 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância da esquistossomose mansoni: Diretrizes técnicas**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 4ª ed. Brasília, 2014.

MOISE, T. et al. Ra isotopes and Rn in brines and ground waters of the Jordan-Dead Sea Rift Valley: enrichment, retardation, and mixing. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 64, n. 14, p. 2371-2388, 2000.

MONROY, M. et al. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. **Science of the Total Environment**, v. 487, p. 233-244, 2014.

MOORE, J. Uma introdução aos invertebrados. São Paulo: **Editora Santos**, 2003.

MORAES, P. R. V. **Projeto fosfato do nordeste – Levantamento aerogamaespectométrico dos estados de Pernambuco e Paraíba**. PETROFÉRTIL/PROSPEC, Relatório final. 1979.

MORENO, V. et al. Characterization of radon levels in soil and groundwater in the North Maladeta Fault area (Central Pyrenees) and their effects on indoor radon concentration in a thermal spa. **Journal of environmental radioactivity**, v. 189, p. 1-13, 2018.

MURRAY, R; HOLBERT, K. E. Nuclear energy: an introduction to the concepts, systems, and applications of nuclear processes. 7ª Edição. **Elsevier**, 2014.

NADALETI, W.C. et al. Cinética e equilíbrio secular das principais séries radioativas e suas implicações ambientais. **Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade**, Pelotas, v.2, n. 2, p 1-16, 2016.

NAKANO, E. et al. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, n. 1-2, p. 145-154, 2003.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11ª Ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2005.

NEUMANN, V. H. M. L. et al. Caracterização do fosforito uranífero no furo 1-ig-03-pe, sub-bacia olinda, em Igarassu(PE). **Geochimica Brasiliensis**, v. 30, n. 2, p. 173, 2017.

NRIAGU, J. et al. High levels of uranium in groundwater of Ulaanbaatar, Mongolia. **Science of the Total Environment**, v. 414, p. 722 - 726, 2012.

ODUM, E. P. Consideration of the total environment in power reactor waste disposal. In: **Proceedings of the International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy**, United Nations, Geneva, p. 350–353. 1956.

ODUM, E. P. Fundamentals of Ecology. Ed 1°. **W.B. Saunders**, Philadelphia, United States. 1959.

OKAZAKI, K. et al. Effect of  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 29, n. 8, p. 1057-1067, 1996.

OKUNO, E; YOSHIMURA, E. M. Física das radiações. **Oficina de Textos**, 1ª Edição, p. 296, 2010.

OKUNO, E. Radiação: efeitos, riscos e benefícios. **Oficina de Textos**, 1ª Edição, p. 144, 2018.

OLIVEIRA FILHO, E. C. et al. Bioassays with freshwater snails *Biomphalaria* sp.: from control of hosts in public health to alternative tools in ecotoxicology. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 61, n. 1, p. 49-57, 2017.

PASTURA, V. F. S. et al. Determinação das doses equivalentes devido a ingestão de radionuclídeos das séries do Urânio e Tório presentes em águas de consumo do município de Santa Luzia, Estado da Paraíba. **Congresso Internacional de Radioproteção Industrial**, Recife, PE, p. 7, 2011.

PERIN, G.; BAUDO R. Ecotoxicologia aplicada: princípios gerais. **Ecotoxicologia integrada quantitativa**. UNIVILLE, Universidade da Região de Joinville, Santa Catarina, p. 14-32, 2005.

PERNA, A. F. N. et al. Exhalation rate of radon-222 from concrete and cement mortar. **Nukleonika**, v. 63, n. 3, p. 65-72, 2018.

PÊSSOA, S. B.; MARTINS, A. V. Parasitologia médica. 11ª Ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, 2011.

PETTA, R. A.; CAMPOS, T. F. C. O gás radônio e suas implicações para a saúde pública. **Revista de Geologia**, v. 26, n. 2, p. 7-18, 2013.

PHILLIPS, D. H.; WATSON, D. B. Distribution of uranium and thorium in dolomitic gravelfill and shale saprolite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 474-482, 2015.

PIMENTEL, D. Life history of *Australorbis glabratus*, the intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* in Puerto Rico. **Ecology**, v.38, p. 576-580, 1957.

PORCELLI, D.; SWARZENSKI, P. W. The behavior of U-and Th-series nuclides in groundwater. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 52, n. 1, p. 317-361, 2003.

- PORCELLI, D. Investigating groundwater processes using U-and Th-series nuclides. **Radioactivity in the Environment**, v. 13, p. 105-153, 2008.
- POST, V. E. A. et al. High uranium concentrations in groundwater in Burundi. **Procedia Earth and Planetary Science**, v. 17, p. 524-527, 2017.
- PRICHARD, H. M.; GESELL, T. F. Rapid measurements of  $^{222}\text{Rn}$  in water with a commercial liquids scintillation counter. **Health Physics**, v. 33, p. 557-581, 1977.
- QU, C. et al. Heavy metal behaviour at mineral-organo interfaces: Mechanisms, modelling and influence factors. **Environment international**, v. 131, p. 104995, 2019.
- RADVANYI, P.; VILLAIN, J. The discovery of radioactivity. **Comptes Rendus Physique**, v. 18, n. 9-10, p. 544-550, 2017.
- RAND, G. M. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. Ed 1°. **CRC press**, 1995.
- RAPADO, L. N. et al. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of helminthology**, v. 85, p. 66-72, 2011.
- RATCLIFFE, N. A. E. A. Invertebrate immunity: basic concepts and recente advances. **International Review of Cytologic**, v. 97, p. 350, 1985.
- REBELO, A. M. A. et al. Modelos de exalação de radônio em paisagens tropicais úmidas sobre granito. **Boletim Paranaense de Geociências**, UFPR, v. 52, 2003.
- REY, L. Schistosoma e esquistossomiase: epidemiologia e controle. 3ª Ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, 2001.
- REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 4ª Ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, 2008.
- RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental Toxicology**, v. 12, n. 4, p. 283-294, 1997.
- ROCHA, A. B. et al. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.
- ROCHA FILHO, C. A. et al. Assessment of toxicity of Moringa oleifera flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. **CHEMOSPHERE**, v. 132, p. 188-192, 2015.
- RODILLA, V. Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 300, p. 281-291, 1993.

ROSEN, M. R. et al. Anthropogenic and geologic causes of anomalously high uranium concentrations in groundwater used for drinking water supply in the southeastern San Joaquin Valley, CA. **Journal of Hydrology**, v. 577, p. 124009, 2019.

SÁ, J. L. F. et al. Evaluation of molluscicidal activity of *Anadenanthera colubrina* extracts on adult mollusc and embryos of the species *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Scientia Plena**, v. 12, p. 1-9, 2016.

SAAD, S. **Aspectos econômicos do aproveitamento do urânio associado aos fosfatos do nordeste**. Boletim nº 7. Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). 1974.

SAKHVIDI, M. J. Z. et al. Applicability of the comet assay in evaluation of DNA damage in healthcare providers' working with antineoplastic drugs: a systematic review and meta-analysis. **International journal of occupational and environmental health**, v. 22, n. 1, p. 52-67, 2016.

SALAMAT, Z.; SULLIVAN, J. T. Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 6, p. 725-727, 2009.

SALBU, B. Challenges in radioecology. **Journal of environmental radioactivity**, v. 100, n. 12, p. 1086-1091, 2009.

SANCHEZ-CABEZA, J. A.; PUJOL, L. I. A rapid method for the simultaneous determination of gross alpha and beta activities in water samples using a low background liquid scintillation counter. **Health Physics**, v. 68, p. 674-682. 1995.

SANTOS, F. P. C. **Radionuclídeos naturais em águas minerais comercializadas na cidade de Recife – PE**. Dissertação (Mestrado) - PROTEN/UFPE, Recife, p. 61, 2010.

SANTOS, F. T. J. et al. Radiosensitizer effect of usnic acid on *Biomphalaria glabrata* embryos. **International journal of radiation biology**, v. 94, n. 9, p. 838-843, 2018.

SANTOS JÚNIOR, J. A. et al. Influence of terrestrial radionuclides on environmental gamma exposure in a uranium deposit in Paraíba, Brazil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 141, p. 154-159, 2017.

SANTOS, M. L. O. et al. Construção de curva de crescimento da atividade do Rn-222 para utilização como fator de calibração para determinação de Rn-222 em água por LSC. **International Joint Conference Radio**. 2017.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SEMINSKY, K. Z.; SEMINSKY, A. K. Radon concentration in groundwater sources of the Baikal region (East Siberia, Russia). **Applied Geochemistry**, p. 104446, 2019.

SHAHBAZI-GAHROUEI, D.; et al. Uma revisão sobre radiação natural de fundo. **Pesquisa biomédica avançada**, v. 2, 2013.

SHARMA, T. et al. Uranium distribution in groundwater and assessment of age dependent radiation dose in Amritsar, Gurdaspur and Pathankot districts of Punjab, India. **Chemosphere**, v. 219, p. 607-616, 2019.

SILVA, A. A. **Dosimetria Radioecologica na Ocorrência Uranífera de São José de Espinharas - PB**. Dissertação (Mestrado) - PROTEN/UFPE, Recife, p. 59, 2014.

SILVA, A. A. **Avaliação radiométrica em água subterrânea consumida em municípios das mesorregiões da Borborema, Central Potiguar e Sertão Paraibano**. Tese (Doutorado) – PROTEN/UFPE, Recife, p. 110, 2018.

SILVA, C. M. **Urânio, radônio-222 e polônio-210 em águas de abastecimento público da região metropolitana do Recife**. Dissertação (Mestrado) – PROTEN/UFPE, Recife, p. 67, 2000.

SILVA, H. A. M. F. et al. Use of *Biomphalaria glabrata* hemocytes as a biomarker of exposure to ionizing radiation. **International Nuclear Atlantic Conference – INAC**, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2017.

SILVA, H. A. M. F. et al. Laboratory assessment of divaricatic acid against *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. **ACTA TROPICA**, v. 178, p. 97-102, 2018.

SILVA, L. R. S. et al. Avaliação da radiosensibilidade de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos à radiação gama. **Scientia Plena**, v. 9, p. 1-6, 2013.

SILVA, L. R. S. et al. Oxidative stress in mollusks *Biomphalaria glabrata* exposed to gamma radiation. **Scientia Plena**, v. 14, n. 7, 2018.

SILVA, M. L.; BONOTTO, D. M. Uranium isotopes in groundwater occurring at Amazonas State, Brazil. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 97, p. 24-33, 2015.

SILVA, M. L.; BONOTTO, D. M. Hidroquímica elementar e dos isótopos de urânio em águas subterrâneas da Formação Alter do Chão, Manaus (AM). **Revista Brasileira de Geociências**, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2016.

SILVA, R. C. et al. Efeitos do oxifluorfen na fecundidade e no teor de proteínas do caramujo *Biomphalaria glabrata*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 18, p. 73-82, 2008.

SILVA, R. C. et al. A interação da radiação gama com a matéria no processo de esterilização. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1624-1641, 2014.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIQUEIRA, W. N. et al. Efeito radioprotetor do extrato de *Ziziphus joazeiro* sobre embriões de *Biomphalaria glabrata* submetidos à radiação ionizante. **Scientia Plena**, v. 10, p. 1-7, 2014.

SIQUEIRA, W. N. Aspectos químicos e genéticos do *Biomphalaria glabrata* como bioindicador / biomonitor de qualidade ambiental. Tese (Doutorado) – PROTEN/UFPE, Recife, p. 120, 2019.

SIQUERIA, W. N. et al. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Chemosphere**, v.249, 2020.

SKEPPSTRÖM, K.; OLOFSSON, B. Uranium and radon in groundwater. **European water**, v. 17, n. 18, p. 51-62, 2007.

SKOOG, D. A. et al. Princípios de Análise Instrumental. 6ª Ed. São Paulo: **Bookman**, p. 1026, 2009.

SOUZA, E. M. **Estratigrafia da sequência clástica inferior (andares coniaciano-maastrichtiano inferior) da Bacia da Paraíba e suas implicações paleogeográficas**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG, Recife, p. 375, 2006.

SOUZA, S. S. **A origem das células de defesa (hemócitos) em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, 2006.

STUMPF, J. L.; GILBERTSON, D. E. Hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: factors affecting variability. **Journal of invertebrate pathology**, v. 32, n. 2, p. 177-181, 1978.

STURCHIO, N. C. et al. Radium geochemistry of ground waters in Paleozoic carbonate aquifers, midcontinent, USA. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 1, p. 109-122, 2001.

TALLARICO, L. F. et al. Dominant lethal effect of <sup>60</sup>Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 561, n. 1-2, p. 139-145, 2004.

TALLARICO, L. F. Freshwater gastropods as a tool for ecotoxicology assessments in Latin America. **American Malacological Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 330-336, 2015.

TAN, W. et al. Distribution of radon and risk assessment of its radiation dose in groundwater drinking for village people nearby the W-polymetallic metallogenic district at Dongpo in southern Hunan province, China. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 151, p. 39-45, 2019.

TELES, H. M. S.; CARVALHO, O. S. Implicações da biologia de *Biomphalaria* no controle da Esquistossomose. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro, **Ed. Fiocruz**, p. 459-484, 2008.

TERRADAS, M. et al. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 60-67, 2010.

TRIPATHI, R. M. et al. Study of uranium isotopic composition in groundwater and deviation from secular equilibrium condition. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 295, n. 2, p. 1195-1200, 2013.

TURNER, J. E. Atoms, radiation, and radiation protection. Weinheim: **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA**, 2007.

UNSCEAR. Sources and effects of ionizing radiation. Volume I: **SOURCES, United Nations Publication**, New York, 2008. Disponível em: [https://www.unscear.org/docs/publications/2008/UNSCEAR\\_2008\\_Report\\_Vol.I.pdf](https://www.unscear.org/docs/publications/2008/UNSCEAR_2008_Report_Vol.I.pdf)  
Acessado em: 01/07/2019.

U.S.E.P.A. - United States Environmental Protection Agency. **Office of groundwater and drinking water rule: technical fact sheet**. Washington, DC. 1999.

U.S.E.P.A - United States Environmental Protection Agency. Summary of biological assessment programs and biocriteria development for states, tribes, territories, and interstate commissions: streams and wadeable rivers. **U. S. Environment Protection Agency**, EPA-822-R-02-048. Washington, DC. 2002.

VALENTE, D. et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, n. 1, p. 1-21, 2017.

VANDECASTEELE, C. M. Environmental monitoring and radioecology: a necessary synergy. **Journal of environmental radioactivity**, v. 72, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

VARDHAN, K. H. et al. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids**, p. 111197, 2019.

YOSHINO, T. P. Encapsulation response of the marine prosobranch *Cirithidea californica* to natural infections of *Renicola buchhanani* sporocysts (Trematoda: Rencolidae). **International Journal for Parasitology**, v.6, p. 423 – 431, 1976.

WARNER, R. et al. Mineralogic investigation into occurrence of high uranium well waters in upstate South Carolina, USA. **Applied geochemistry**, v. 26, n. 5, p. 777-788, 2011.

WEBSITE:“<http://www.perkinelmer.com.br/brochuras/NexION%20300%20ICPMS.pdf>”.  
Ficha técnica do ICP-MS modelo NexION 300 da marca PerkinElmer, 2010. Acessado em: 29/11/19.

WEBSITE:“[https://www.perkinelmer.com/content/manuals/gde\\_quantulusinstrumentmanual.pdf](https://www.perkinelmer.com/content/manuals/gde_quantulusinstrumentmanual.pdf)”.  
Ficha técnica da Cintilação líquida modelo Quantulus 1220 da marca PerkinElmer, 2002. Acessado em: 15/01/2020.

WEN, X. et al. Influence of coastal groundwater salinization on the distribution and risks of heavy metals. **Science of The Total Environment**, v. 652, p. 267-277, 2019.

WHO – World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. ED 3°. **WHO chronicle**, 2006.

WHO – World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. ED 4°. **WHO chronicle**, 2011.

WU, Y. et al. Occurrence, behavior and distribution of high levels of uranium in shallow groundwater at Datong basin, northern China. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 809-817, 2014.

WYLLIE, A. H. et al. Cell death: the significance of apoptosis. **International review of cytology**, v. 68, p. 251-306, 1980.