

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As operações de preservação ambiental são partes integrantes de vários estudos em todo o Brasil e no mundo. Por isso, a orientação permanente das autoridades governamentais, é conduzir as operações procurando evitar impactos e agressões ao meio ambiente. Apesar das novas tecnologias que surgem a cada ano para a manutenção e o cuidado com o meio ambiente, a contaminação deste, é uma preocupação constante dos órgãos governamentais que, procuram novas metodologias de detecção de falhas “deixadas” por indústrias ou de monitoração, para que estes possam ser utilizados de maneira a produzir um benefício ao homem. Para essa busca de controle e manutenção ambiental, têm surgido, ao longo dos anos, formas de monitoramento e de controle para o meio ambiente.

Uma das questões polêmicas que envolve o cuidado com o meio ambiente e a saúde humana é a questão relacionadas às baixas doses de radiação ionizante. Nas primeiras décadas do século XX, quando as radiações ionizantes já faziam parte das práticas médicas rotineiras, partiu-se da premissa da existência de um limiar de dose abaixo do qual o risco de dano à saúde do indivíduo irradiado era improvável. A premissa estendia-se à indução de leucemias e de câncer, visto que, até então, só haviam sido observados, apenas após a exposição de indivíduos a altas doses de radiação (Bond,1981;Calabrese,1994).

I.1 – Estudos Iniciais: Radiações Ionizantes *versus* Efeitos Genéticos

Em 1927, Herman J. Muller estudando o efeito de raios-X em *Drosophila*, colocou em evidência que os mesmos eram mutagênicos. Com a ajuda de Nikolai Timofeff-Ressovsky, observou a existência de uma relação linear entre a dose de radiação à qual o organismo era exposto e o número de mutações produzidas. Timofeff notou, a partir dos resultados obtidos, a ausência de uma dose limiar, isto é, uma dose mínima abaixo da qual não fossem observadas mutações. O fato causou profundo impacto na comunidade científica da época e contribuiu significativamente para a formulação da hipótese da

linearidade entre a dose e o efeito e da ausência de um limiar para esses efeitos (Hendee,1996; IAEA,1978).

Outros trabalhos realizados com *Drosophila*, envolvendo diferentes autores, confirmaram as observações de Muller e Timofeff. De acordo com os artigos da época, ficava entendido que mesmo pequenas exposições poderiam aumentar a probabilidade de mutações e, conseqüentemente, a incidência de cânceres e de doenças hereditárias, em uma população exposta à radiação (Okono,1988; Kondo,1993).

A hipótese da linearidade entre a dose e o efeito e da ausência de um limiar de dose (LNT - Linear Non Threshold) se manteve, em sua forma original, por aproximadamente uma década, quando W. Russell, do Oak Ridge National Laboratory, se propôs a testar sua validade, em ratos. Em seus resultados, notou que a observação de Timofeff, referente à linearidade do fenômeno, não se confirmava para baixas taxas de dose (Russel,1956) quanto menor a taxa de dose, maior a dose necessária para a produção de um mesmo efeito. O extremo do fenômeno foi observado em fêmeas de rato, nas quais nenhum efeito genético era detectável, se as taxas de dose fossem mantidas suficientemente baixas.

Os resultados obtidos por Russel, permitiam vislumbrar a existência de mecanismos aos quais a célula recorre para se proteger contra a ação das radiações ionizantes e, provavelmente, contra outros agentes agressores do material genético. Esses recursos foram pouco visíveis, quando da exposição a altas doses e altas taxas de dose, e não foram considerados, quando se estabeleceu a hipótese LNT. A relação linear observada entre a dose e a indução de indivíduos mutantes, a partir da irradiação de esperma maduro de *Drosophila*, foi justificada pelo alto nível de diferenciação celular sofrido pelo esperma que, praticamente sem citoplasma e sem atividade celular qualquer, perde a capacidade de reparo do material genético que transportam (Sparrow *et al*,1972).

O fato de ter sido colocada em evidência a existência de mecanismos de reparo para danos introduzidos no material genético das células e a discrepância observada entre as previsões de incidência de efeitos genéticos, elaboradas a partir de modelos baseados na LNT e em resultados experimentais, abriu, junto aos organismos internacionais responsáveis pelas diretrizes de proteção radiológica, a discussão de como, sem abandonar a LNT, levar em consideração as novas evidências (Bond,1981; Hendee,1996).

Na década de 1960, a Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos criou um

comitê com a incumbência de promover o levantamento de todos os dados da literatura relativos às relações “dose-resposta”. O resultado dessa iniciativa foi o Relatório do "BEIR I", Biological Effects of Ionizing Radiation I, em 1972. Para se posicionar sobre a indução de efeitos genéticos por ação das radiações, o comitê se embasou em estudos envolvendo animais. Estudos envolvendo seres humanos não foram localizados. Para seu posicionamento em relação à carcinogênese, o Comitê se baseou, principalmente, em estudos envolvendo seres humanos. O efeito resultante da diminuição da taxa de dose na relação dose-resposta foi admitido no corpo do relatório, porém, não foi incorporado aos “coeficientes de risco” gerados pelo Comitê (NAS 70,1970).

Para o UNSCEAR, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, (Comitê Científico para os Efeitos da Radiação Atômica das Nações Unidas), o coeficiente de risco, considerados todos os cânceres, é de $1 \times 10^{-4}/\text{rem-ano}$ ($1 \times 10^{-2}/\text{Sv-ano}$). Esse coeficiente foi utilizado nas Publicações 26 e 27 da ICRP, International Commission on Radiological Protection, (Comissão Internacional de Proteção Radiológica) (ICRP/77A, ICRP/77B,1977).

Segundo o IAEA, International Atomic Energy Agency, (Agência Internacional de Energia Atômica) em 1978, os ataques nucleares às cidades de Hiroshima e Nagasaki proporcionaram uma oportunidade única para o entendimento dos efeitos da exposição de uma população humana a baixas e altas doses de radiação. Até então, os estudos relativos aos efeitos genéticos das radiações se limitavam à exposição de pequenos animais a altas doses. Os estudos realizados nas populações de Hiroshima e Nagasaki contribuíram para confirmar a hipótese da LNT, apesar de não terem sido identificados, nos descendentes das populações irradiadas, efeitos hereditários passíveis de serem imputados às explosões nucleares. O aumento significativo da incidência de leucemia e tumores sólidos nas populações irradiadas e a relação dose/efeito observada, mesmo para doses consideradas baixas, confirmavam a hipótese LNT; também confirmava a indução de leucemias e de cânceres, como os principais efeitos produzidos nas populações sobreviventes (IAEA,1978).

Nesse contexto e para fins de proteção contra o efeito das radiações, numa atitude reconhecidamente de prudência, ficou estabelecido que qualquer dose, por menor que fosse, representava um risco para a saúde do indivíduo irradiado (ausência de um limiar de dose)

e que esse risco poderia ser estimado com base nas observações realizadas para altas doses (Hipótese da Linearidade Dose-Efeito).

O Comitê do Conselho Nacional de Proteção Radiológica e de Medidas - NCRP, também envolvido com a questão da validação da LNT para câncer em seres humanos, frente à inexistência de dados conclusivos sobre a questão, se propôs a realizar um levantamento bibliográfico exaustivo, na área da radiobiologia, de modo a verificar a possibilidade de serem estabelecidas algumas generalidades ou levantados alguns fatos que viessem a reforçar uma confiabilidade na adoção da LNT, nesse caso específico (Calabrese, 1994).

Nos relatórios em que algum crédito foi dado para o efeito “taxa de dose”, os questionamentos se relacionavam com a forma de introduzi-lo nas estimativas dos coeficientes de risco e na estimativa de respostas para taxas de dose extremamente baixas (Jaworowski, 1995 e 1997).

Em suma, a questão da LNT, embora tenha sido tratada, nesta introdução, de maneira bastante superficial, deixa elucidado que a questão dose-resposta, para o caso das baixas doses, permanece aberta, sendo seus efeitos para a saúde ambiental de interesse mundial, e, em decorrência, à saúde humana. Evidencia-se a falta de respaldos experimentais técnicos-científicos consistentes que permitam às autoridades pertinentes uma tomada de decisões específicas de proteção radiológica. Sendo assim, torna-se de crucial importância o desenvolvimento de projetos de pesquisa voltados especificamente para as doses baixas e de sua ligação com as questões da proteção contra possíveis efeitos danosos das radiações ionizantes à saúde humana e aos seres vivos em geral.

O biomonitoramento vem a cada ano tomando espaço na comunidade científica, principalmente os ensaios com plantas que tornam o trabalho mais fácil do ponto de vista da legislação, em contrapartida aos ensaios com animais. A pesquisa com a *Vicia Faba* (Grant, 1999; Savage, 1990) tem sido bastante aplicada em estudos sobre genotoxicidade e poluição ambiental, tanto com testes de micronúcleos como os “comet assay” (Gichner, 2003). No Laboratório de Neutronografia em Tempo Real, LNRTR/COPPE/UFRJ, estuda-se a possibilidade de avaliar a planta sensitiva (*Mimosa debilis*), vulgarmente conhecida como “Dormideira” como um novo bioindicador, em uma outra linha de pesquisa, que visa o levantamento de seu potencial sensitivo a agentes genotóxicos. Esses estudos demonstram

que o biomonitoramento vem sendo amplamente explorado, surgindo novas metodologias e novos tipos de biomonitores, de forma a contribuírem com as pesquisas científicas.

Visando esta contribuição, ou seja, o estudo sobre o biomonitoramento de áreas controladas ou supervisionadas, que tenham grande relevância para a avaliação dos efeitos mutagênicos em baixas taxas de doses sobre o meio ambiente, a *Tradescantia* é uma planta que demonstra ser uma boa alternativa. Ela apresenta características peculiares, sendo também considerada uma planta ótima para a ornamentação, sendo facilmente manipulada e identificada, fornecendo respostas confiáveis para avaliação experimental (Suyama, 2002).

I.2. Objetivo

O estudo proposto refere-se ao desenvolvimento de uma pesquisa científica, de suma importância para o Brasil e de interesse internacional, sobre a questão da disposição de rejeitos radioativos e as freqüentes discussões sobre as baixas doses de radiação nas proximidades de depósitos de rejeitos radioativos e seu impacto no meio ambiente. Assim, esse estudo tem o objetivo de avaliar o potencial mutagênico de depósitos de rejeitos radioativos, fazendo uso de bioindicadores vegetais e dessa forma colaborar com a comunidade científica. Para tal, seguiu-se os itens:

- 1) Avaliar, experimentalmente, dados que contribuam com as comunidades científicas, visando subsidiar o entendimento do comportamento desse sistema biológico (*Tradescantia*), quando submetidos a baixas taxas de doses de radiações ($< 200 \mu\text{Gy/h}$), em torno de depósitos de rejeitos radioativos;
- 2) Estabelecer uma escala de efeitos mutagênicos para as diferentes taxas de doses de radiação;
- 3) Realizar medidas comparativas entre as diferentes regiões próximas aos DRR escolhidos, para a avaliação dos efeitos mutagênicos;
- 4) Avaliar o impacto genotóxico nos bioindicadores produzidos pelas taxas de doses de radiação ionizantes encontradas nos DRR.

I.3. Relevância

Visando contribuir com resultados que possibilitem algum esclarecimento sobre as freqüentes discussões que envolvem projetos de implantação de depósitos de rejeitos radioativos, o estudo realizado em pontos estratégicos poderá, através da metodologia, fornecer um embasamento experimental que contribua significativamente para a pesquisa dos efeitos biológicos provenientes da exposição de organismos vivos frente a baixas taxas de dose nesses locais.

CAPÍTULO II

BIOINDICADORES

A utilização de plantas como bioindicadores tem tido cada vez mais um papel importante nas pesquisas relacionadas ao controle de poluentes atmosféricos e à presença de radionuclídeos naturais ou artificiais. Em regiões de clima tropical, o biomonitoramento com o emprego de plantas ainda é pouco utilizado, ao contrário dos países desenvolvidos, onde essa metodologia é vista como uma forma rápida e segura de se obter informações e ainda de se prever os riscos a que a população humana está submetida.

Por várias razões, o nosso ecossistema emite alarmes que irão sinalizar os danos ambientais e garantir a segurança de seus habitantes, transformando-se em um ótimo sensor para a saúde ambiental. De uma forma geral, as plantas são membros essenciais do ecossistema e oferecem uma maior sensibilidade aos estresses ambientais do que outros seres disponíveis para bioensaios (Fritsch *et al*, 2000).

No projeto EuroBio, realizado durante os meses de agosto e setembro de 2000, as plantas utilizadas mostraram um gradiente de impacto de ozônio, do Norte para o Sul e Centro da Europa, com efeitos leves, na Escócia e Dinamarca, e fortes, nas plantas expostas na Itália, França, Áustria e Sul da Alemanha. Foram utilizadas plantas de: tabaco, em dez cidades européias; Choupo; Tradescantia; Azevém e couve, para completar os estudos (Klumpp *et al*, 2001).

Bioensaios com plantas são adequados porque elas funcionam como monitores ambientais e, portanto, sensores de risco para o meio ambiente. Sendo assim, a maioria dos ensaios com plantas vêm sendo promovidos pelo Programa Internacional de Segurança Química, IPCS (International Programme on Chemical Safety), juntamente com o Programa Ambiental das Nações Unidas, UNEP (United Nations Environment Programme), a Organização Internacional do Trabalho, ILO (International Labour Organization) e a Organização Mundial de Saúde do Trabalho, WHO (World Health Organization). Atualmente, eles são usados também pelo Programa Internacional de

Bioensaios com Plantas, IPPB(International Programme of Bioassay with Plants), sob a supervisão da UNEP (Grant, 1994; Grant, 1999; Gopalan, 1998).

Os bioensaios genéticos com plantas, para a detecção de aberrações cromossômicas e mutações de genes, começaram a receber o reconhecimento de que eram sensíveis e seguros, somente na década de 1970. Porém, a maioria desses sistemas já havia sido empregada em experimentos com radiação anteriormente. (Hall *et al*, 1964; Savage, 1967; Underbrink *et al*, 1970; Brewen *et al*, 1971; Sparrow *et al*, 1972; Underbrink *et al*, 1973a; Underbrink *et al*, 1973b; Nawman *et al*, 1975. Underbrink *et al*, 1975a; Underbrink *et al*, 1975b; Nawman *et al*,1976; Sparrow *et al*;1976; Nawman *et al*,1977; Ma,1979). A *Tradescantia*, a *Allium* e o *Cripis*, por exemplo, eram usados em estudos de radiação, desde 1930. Há especulações de que a *Vicia Faba* já teria sido utilizada em ensaios com radiações ionizantes, em 1913 (Grant,1999) .

Em 1970, os bioensaios foram recomendados pela Real Academia Sueca de Ciências, Comitê de Mutagênese Ambiental e Sociedade de Mutagênese Ambiental, juntamente com a Organização Mundial da Saúde, para monitorar e verificar as mutações, visando o estudo da genotoxicidade no meio ambiente. Muitas espécies de plantas foram utilizadas, algumas por análises em suas raízes, como no teste com a *Allium*. A maioria das espécies utilizadas foi da cepa de *Allium*, da *Tradescantia*, da *Vicia Faba* e da *Zea Mays*. Algumas plantas foram usadas para o estudo das mutações de genes e das aberrações cromossômicas (Savage,1990).

Em 1978, um seminário patrocinado pelos EUA, através do Instituto Nacional de Ciências Ambientais da Saúde, organizado por Fred de Serres e intitulado “Higher Plant Systems as Monitors of Environmental Mutagens”, mostrava as características peculiares de sistemas com plantas, que apresentaram resultados positivos por apontar e monitorar atividades de mutagêneses. Esse seminário teve alto êxito, por focalizar, pela primeira vez, a importância de bioensaios com plantas para testar e monitorar mutagêneses ambientais em larga escala pela comunidade científica. Como resultado, esse seminário foi responsável por conduzir ao próximo passo, o programa “Gene-Tox” (Grant,1999).

Em 1979, no escritório de Substâncias Tóxicas dos EUA, a Agência de Proteção Ambiental iniciou o programa “Gene-Tox”, amplamente focalizado para os bioensaios microbiano, animal, e com planta, cuja finalidade era avaliá-los em termos da toxicologia

genética. O Programa “Gene-Tox” reunia 24 grupos de trabalho, onde um deles, o “Plants Working Group”, era composto de 10 sócios: M. Constantin (o líder de grupo), W.F. Conceda, Te-H. Ma, R. Nilan, M. Plewa, G. Rédei, S. Sandhu, L. Schairer, J. Van't Hof e B. Vig. As metas do programa Gene-Tox consistiam em avaliar os principais organismos e os bioensaios usados para a descoberta de mutagênese/carcinogênese (Ma,1982).

Na década de 80, aconteceu a conferência, “*Pollen Systems to Detect Biological Activity of Environmental Pollutants*”, patrocinada pelo Instituto Nacional de Ciências de Saúde Ambientais dos EUA e pela Agência de Proteção Ambiental. Nessa conferência, várias espécies foram identificadas, nas quais poderiam ser usados os sistemas de pólen para a descoberta e monitoramento de genotoxicidade ambiental. Na ocasião, T. H. Ma descreveu detalhadamente os bioensaios com a *Tradescantia* Micronúcleos para a monitoração “*in situ*” da mutagênese (Ma,1981; Ma *et al*,1982; Delone *et al*,1981). A partir de então, vários cientistas, em diversas partes do mundo, começaram a utilizar esses ensaios (Delone,1981; Ichikawa,1981; Ma *et al*, 1984; Tano;1989).

Em 1984, o Programa Internacional em Segurança Química (IPCS) iniciou o estudo de Sistemas de Bioensaios com Plantas, em cooperação com a UNESP e a Organização Mundial de Saúde (WHO). Os objetivos do estudo eram: (1) a calibração dos bioensaios com plantas selecionadas para o potencial mutagênico, como detector de substâncias químicas ambientais e (2) avaliação comparativa entre laboratórios “e de variabilidade dentro de cada laboratório, para cada ensaio, de forma que eles pudessem ser usados sobre uma base mundial. Um relatório preliminar do IPCS/WHO sobre este sistema de planta foi publicado em 1991. O estudo foi finalizado, em uma reunião em Saint Petersburg, Rússia, em 1992, e os detalhes técnicos e objetivos dos estudos foram publicados no periódico *Research Mutation*, em 1994. Infelizmente, o Programa Internacional em Segurança Química não foi consolidado para continuar esse projeto, visando ampliar os testes e o monitoramento numa escala global” (Ichiwaka,1992;Grant,1994;Cebuska,1994).

Em 1994, Te-Hsiu Ma iniciou o Programa International de Bioensaios com Plantas, onde reuniu vários resultados e divulgou seu protocolo de bioensaios. (Ma *et al*, 1982,1994 e 1998).

Em 1995, realizou-se o Seminário Internacional, “Workshop on Plant Bioassays for Global Environment”, sob o patrocínio do Programa Ambiental das Nações Unidas, na Ocean University, Qingdao, na República da China, que foi altamente próspero, com participantes de 14 países (excluindo os delegados chineses), onde foram avaliadas seis categorias de contaminação ambiental (ar, solo, águas superficiais e águas profundas, pesticidas, radiação) através de testes com plantas (Gopalan,1998; Ma,1998).

Apesar de todo o progresso alcançado na proteção do meio ambiente durante as últimas décadas, a poluição gerada representa um dos principais problemas ambientais no mundo inteiro. A concentração elevada de poluentes, tanto no ar, no solo, como na água, representa um risco para a saúde humana. É fundamental que se tenha um método rápido e sensível capaz de antecipar qualquer dano ao meio ambiente, de maneira fácil e eficaz.

Com o avanço da tecnologia, o homem busca a todo o momento novas formas de energia e meios para facilitar sua vida. Com isso, ao utilizar a tecnologia nuclear, cresce a produção de rejeitos radioativos no mundo inteiro. A cada ano, toneladas deles são gerados e armazenados em depósitos. A grande preocupação reside nos efeitos que eles podem causar no meio ambiente e, por conseqüência, na interferência deles na saúde humana. Assim, pesquisas são feitas para o controle e monitoramento do meio ambiente, sendo fruto crescente de discussões e focando sempre a preocupação com os efeitos biológicos decorrentes de baixas doses de radiação sobre o homem e sobre seu habitat.

II.1 Levantamento histórico de um bioindicador

Alterações morfológicas em plantas são sintomas usados na bioindicação, em função da facilidade do trabalho e da descomplicação na identificação e avaliação das alterações, não sendo necessários laboratórios especializados. Diferentes indicadores morfológicos, para diferentes fatores de estresse, já foram testados, de forma que é possível se realizar uma indicação, a longo ou curto prazo, para concentrações baixas ou elevadas de poluentes, ou de exposição à radiação, como visto anteriormente.

O desenvolvimento na área do monitoramento biológico provocou o surgimento de inúmeras designações para métodos e enfoques que se desenvolveram em conexão com diferentes linhas de pesquisas e aplicações práticas.

A utilização de um sistema bioindicador com plantas vem apontando uma série de vantagens ao longo do tempo, principalmente, em se tratando das plantas superiores, que são organismos eucarióticos cuja complexidade genética (em termos de quantidade total de DNA por núcleo, genes estruturais, organelas, morfologia cromossômica, etc.) é similar à do homem; são multicelulares com complexa organização sistêmica; possuem desenvolvimento embrionário, onde também ocorrem a determinação, a competência e a hereditariedade celular (Sant'Anna, 2003; Constantin, 1982).

II.2 Bioensaios

Dentre os bioensaios mais utilizados, destacam-se os que utilizam a planta *Tradescantia*. Por apresentar um ciclo de vida curto, suas respostas biológicas ao estresse a que for submetida, podem ser avaliadas em um intervalo curto pós-exposição (de forma aguda ou crônica). Sua exposição direta permite a avaliação da contaminação de solos, água, atmosfera e de substâncias específicas. A maioria dos bioensaios com vegetais apresenta uma ótima sensibilidade (baixa ocorrência de respostas falsas-negativas) (Ennever *et al*, 1998). A *Tradescantia* é uma planta ornamental de pequeno porte com algumas características que a torna um material extremamente útil para a condução de experimentos envolvendo danos no material genético de suas células, em se tratando de exposições tanto em baixas como em altas doses de radiação ionizante, apresentando respostas bastante satisfatórias.

Do uso intenso da *Tradescantia* em estudos genéticos, encontrou-se uma série de características que permitem a detecção de agentes que afetam a estabilidade do genoma. Pelo menos, quatro dessas características foram selecionadas como indicadores em bioensaios de avaliação de toxicidade genética, sendo os mais utilizados: 1) o ensaio de mutação para célula cor de rosa em pêlos estaminais, com a espécie Trad-SHM (*Tradescantia Stamen Hair*), que é um teste de mutação mitótica pontual e se baseia na expressão de um gene recessivo para a cor da flor em plantas heterozigotas; 2) o teste

citogenético, que se baseia na formação de micronúcleos (Trad-MCN) e resulta de uma quebra cromossômica nas células meióticas geradoras do pólen.

A propagação da *Tradescantia* é feita vegetativamente, através de estacas, o que permite a obtenção de clones originários de uma única planta, que são cultivados e mantidos em vasos comuns de mesmo tamanho. Os cuidados a serem tomados são os mesmos para qualquer planta ornamental, sendo proibido o uso de qualquer tipo de agrotóxico; no entanto, deve haver um suprimento metódico de fertilizante à base de NPK (nitrogênio, fósforo e potássio), em proporções iguais. O ideal é que o cultivo dessa planta seja feito em câmaras climáticas, sob controle de luz, umidade e temperatura. Quando isso não é possível, uma casa de vegetação oferece condições razoáveis.

II.2.2. *Tradescantia Stamen Hair* (Trad-SHM):

Na *Tradescantia*, as flores surgem na forma de inflorescências sendo que cada uma é constituída de vários botões florais de tamanhos e idades diferentes, o que garante a abertura de, no mínimo, uma flor, diariamente. Cada flor possui seis estames, três petálicos e três sepálicos, sendo que o número de pêlos estaminais pode variar, conforme a linhagem, de 50 a 120 pêlos. Cada pêlo é constituído por uma cadeia linear de células, todas originárias de uma mesma célula epidérmica do filamento estaminal. O número de células, por pêlo, varia de 20 a 50.

A *Tradescantia*, clone 4430, tem a cor de suas flores definida por um par de genes que pode ser AA, Aa ou aa. Clones AA são puros para a cor azul; clones aa são puros para a cor rosa. Clones Aa são azuis, porém, apresentam o gene para rosa. No caso dos clones utilizados na investigação de mutações, o par de genes responsável pela cor das células é o par Aa. O gene “a” é responsável pela substituição da cor azul dominante, pela cor rosa, quando o gene A deixa de se manifestar. A não manifestação do gene dominante (A) indica que o mesmo foi danificado. Conseqüentemente, a presença de células rosas em um universo de células azuis indica a presença de mutação do gene A e a alteração no material genético da célula que se observa. Como os pêlos estaminais crescem, através de divisões sucessivas de células, as freqüências de mutações, bem

como os dados de sobrevivência celular, podem ser razoavelmente comparados com os dados de uma cultura de células ou de microorganismos (Ichikawa,1992).

Sparrow e *colaboradores* (1972) estudaram o efeito da exposição da *Tradescantia* aos nêutrons e aos raios-x e encontraram uma relação linear dose-resposta, para ambos os agentes, para altas doses.

A frequência de mutações espontâneas de vários clones e híbridos de *Tradescantia* foram determinados com base em uma seqüência de investigações realizadas no Brookhaven National Laboratory (BNL) (Underbrinck *et al*, 1970). Os clones BNL 4430 e BNL 02 apresentaram frequências inferiores àquelas dos clones puros da espécie, sendo, por isso, considerados os mais adequados para a experimentação (Underbrinck *et al*,1973a; Underbrinck *et al*,1973b e; Underbrinck *et al*,1975a;Underbrinck *et al*,1975b).

Dentre os bioensaios realizados em curtos intervalos de tempo, alguns são de interesse particular, porque respondem a uma exposição ambiental em dose com tanta sensibilidade quanto possível à resposta de células humanas, o que torna viável a comparação de dados em pesquisas, para fins de prevenção (Sparrow *et al*, 1972). O bioensaio pela Trad-SHM tem várias características intrínsecas, sendo muito indicado para estudos ambientais. Em 1984, Ma apresentou em seu trabalho alguns dos resultados sobre a genotoxicidade dos agentes ambientais estudados em células somáticas da *Tradescantia* e apontou o método de micronúcleos como altamente eficaz e seguro para avaliar a genotoxicidade ambiental (Ma, 1994).

II.2.2. *Tradescantia* Micronucleus (Trad-MCN):

Mais de 30 anos após a observação de micronúcleos, a partir da detecção de danos à meiose, Steinitz, Ma e colaboradores, desenvolveram o ensaio do micronúcleo-na-tétrade (Trad-MCN) no Laboratório Nacional de Brookhaven. Empregando a espécie híbrida 4430, eles compararam a produção de micronúcleos nas células mães do pólen com as células cor de rosa dos pêlos estaminais da *Tradescantia*, quando exposta ao 1,2 dibromoetano (DBE) (Steinitz,1944;Ma *et al*,1978). Naquela época, os ensaios da

mutação em pêlos estaminais vinham sendo amplamente empregados, tornando-se um teste reconhecido para a mutagênese radiobiológica e química. O ensaio do micronúcleo demonstrou ser altamente eficiente com uma sensibilidade extraordinária, dada à especificidade de ser necessário um dano muito menor para produzir os micronúcleos, quando comparada a do ensaio envolvendo a mutação dos pêlos estaminais (Underbrink *et al*,1973b).

A sensibilidade e a simplicidade do ensaio Trad-MCN foram ainda demonstradas em experimentos nos quais se empregaram baixas doses de raios-X e dois agentes mutagênicos: metanossulfonato de etila (SEM) e azida sódica (NaN_3) em ambas as formas: gasosa e líquida. Uma dose de raios-X de 20 rad (200mGy) induziu alta frequência de micronúcleos (23 MCN/100 tétrades), enquanto uma frequência de 1,8 MCN/100 células foi induzida por 50 rad (500mGy) de raios-X, em linfócitos humanos, e de 2,5 MCN/100 entoblastos de camundongo, em cultura de medula óssea, quando exposta a 35 rad (350mGy) de raios-X. Enquanto ocorria 0,2% de mutações por rad, no ensaio de pêlo estaminal (Trad-SHM), ocorria 1,6% MCN por rad, no ensaio Trad-MCN. A relação dose efeito no ensaio Trad-MCN com raios-X mostrou-se mais sensível que a Trad-SHM (Rodrigues, 1999).

Uma vantagem adicional no ensaio Trad-MCN é o curto período de exposição (6h) necessário para se completar um teste, seguido de uma recuperação de 24 horas, para permitir que as células expostas na prófase atinjam o estágio de tétrade, apropriado para a contagem de micronúcleos. Essa periodicidade da meiose foi testada em um estudo da sensibilidade dos estágios, usando raios-X em *Tradescantia paludosa*. Grupos de inflorescências receberam uma dose de 35 rad (350mGy) de raios-X, após o que as inflorescências foram removidas e fixadas em intervalos de 3h, durante 48 h, após a irradiação (Ma *et al*,1982).

O emprego do ensaio Trad-MCN para o monitoramento de agentes clastogênicos ambientais foi primeiramente proposto, após estudos envolvendo agentes pós-mutagênicos em localidades poluídas. Uma vantagem percebida é que nenhuma atividade enzimática externa é necessária para ativar os agentes pró-mutagênicos, dado que o aparato enzimático continuava totalmente funcional nas inflorescências extraídas das plantas e expostas aos tratamentos (Ma, 1979; Ma, 1981; Rodrigues,1999).

O bioensaio da *Tradescantia* Micronúcleos (Trad_MCN) foi um dos testes usados no Programa Internacional de Bioensaios com Plantas (IPPB) e do Programa de Meio Ambiente das Nações Unidas (UNEP). Usando os danos sobre o cromossoma como o bioindicador das propriedades carcinogênicas de agentes ambientais, em formas gasosas, líquidas e sólidas, esse ensaio demonstrou ser uma ferramenta rápida e eficiente para selecionar células carcinogênicas. Em 1981, um protocolo padrão foi apresentado (Ma,1981) e foi divulgada uma lista de resultados de testes de carcinogênese e genotoxicidade compilados nos anos posteriores (Ma, 1982; Ma 1983; Ma,1984). Sob a coordenação do IPPB/UNEP, mais de quarenta instituições, incluindo as pesquisas públicas, relacionadas ao estudo do câncer nos países desenvolvidos, que executam tarefas de monitoramento do ar, da água e de solo poluídos. Assim, o sistema Trad_MCN pode ser usado em uma escala global como método preventivo para detectar carcinogênese (Ma, 1998).

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

III.1. Rejeitos radioativos no Brasil.

"Lixo atômico" é o termo popular empregado para designar o "material" radioativo gerado nos reatores nucleares e nas usinas de reprocessamento de elementos combustíveis usados. Contudo, o termo utilizado pela comunidade científica é "**rejeitos radioativos**", que abrange todos os materiais que não podem ser reaproveitados e que contêm substâncias radioativas em quantidades tais que não podem ser tratados como lixo comum (CNEN – NE-6.05,1985).

Os rejeitos originam-se nas instalações radioativas, instituições de pesquisa, laboratórios de análises clínicas, hospitais, indústrias e universidades. Os materiais mais comuns que constituem essa categoria são: rejeitos sólidos (compostos de luvas, papéis, algodão, vidros e mais uma série de materiais comumente utilizados em laboratório que, através de contacto com substâncias radioativas, acabam contaminados); e os rejeitos líquidos (constituídos principalmente da água utilizada na descontaminação de instrumentos e das soluções que são utilizadas nas análises de laboratório), deverá estar incorporado em matriz, homogeneamente distribuído e com um mínimo de material segregado, formando um produto monolítico (CNEN – NE-6.09,2002).

No Brasil, a CNEN, Comissão Nacional de Energia Nuclear, é o órgão federal responsável pelo licenciamento e fiscalização das instalações nucleares e radioativas. Ela exerce controle sobre todo o material nuclear, de forma a garantir a segurança da população, trabalhadores e o meio ambiente, e, na área de rejeitos radioativos, estabelece normas de controle que cobrem todas as atividades concernentes ao gerenciamento desses rejeitos, desde a sua origem até o armazenamento final.

As substâncias radioativas utilizadas nessas instalações são produzidas artificialmente, a partir de substâncias não radioativas, em aceleradores de partículas ou,

principalmente, em reatores nucleares, os quais, para funcionar, necessitam de combustível nuclear, como, por exemplo, o urânio. Para poder ser utilizado nos reatores, o urânio é extraído de minérios, concentrado, purificado e processado. Devido ao processo de mineração, há uma enorme quantidade de rejeitos, com volumes e atividades muito maiores que os rejeitos institucionais e têm, além disso, uma variedade grande de composição. Tanto podem ser as milhares de toneladas de material com baixa radioatividade das sobras do minério, como os poucos litros de líquido com altíssima radioatividade, que resultam do reprocessamento do combustível nuclear, após seu uso no reator.

Há ainda um terceiro grupo, constituído dos rejeitos radioativos que são gerados, quando as instalações do ciclo do combustível são desmontadas, no fim da sua vida útil. São compostos na maior parte de metais e materiais da construção que estão contaminados. A maior parte vem do descomissionamento dos reatores nucleares.

III.2 – Tratamento e Disposição dos Rejeitos Radioativos

Os rejeitos radioativos precisam de tratamento especializado, para evitar danos ao homem e ao meio ambiente, da mesma forma que qualquer resíduo convencional. Para tanto, deve-se seguir um protocolo específico, desde a coleta dos rejeitos nos pontos de origem até seu ponto de destino e armazenamento, obedecendo aos requisitos de proteção aos trabalhadores, aos indivíduos do público e ao meio ambiente. Esse protocolo é descrito pela Gestão de Rejeitos Radioativos, constantes da norma CNEN-NN-6.09,2002, estando de acordo com as recomendações da IAEA (IAEA,1991; IAEA,1992). A norma CNEN-NN-6.09 estabelece as regras para: a coleta; a segregação dos diversos tipos de rejeitos; o tratamento; o armazenamento e a disposição final. As Figuras III.1 e III.2 mostram a disposição dos rejeitos radioativos no DRR/Usina Nuclear de Angra I.



Figura III.1. Disposição dos rejeitos, armazenados no depósito da Usina Nuclear Angra I.



Figura III.2. Visão geral do armazenamento de rejeitos radioativos dentro do depósito da Usina Nuclear Angra I.

III.3 Depósitos de Rejeitos Radioativos.

Por enquanto, os rejeitos radioativos de média atividade gerados no Brasil compreendem os elementos combustíveis queimados, que estão sendo armazenados na própria central nuclear, pois ainda não foi definida uma política nacional sobre o seu reprocessamento para o reaproveitamento do plutônio e do urânio nele contidos. Não há, portanto, previsão sobre o gerenciamento desses rejeitos.

O Governo, após o acidente radiológico de Goiânia, com a disseminação do radionuclídeo Césio-137, decidiu construir um repositório permanente para o material gerado pelo acidente, denominado Repositório da Abadia de Goiás (GO). Porém, ainda se faz necessária a criação de outros depósitos, para os rejeitos de atividades baixa e média, que estão sendo gerados rotineiramente no País. Esses rejeitos estão sendo armazenados em depósitos provisórios, o que leva a discussões políticas e a questões de segurança. Os locais de armazenamento estão localizados nos institutos de pesquisa subordinados à Comissão Nacional de Energia Nuclear, onde são tratados os rejeitos gerados nos próprios institutos e aqueles recolhidos em hospitais, clínicas, indústrias e outras instituições, nos quais estima-se que:

- No Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, em São Paulo, estão cerca de 1200 tambores, ocupando um volume de 250 m^3 , e tendo uma atividade de 220 TBq.*
- No Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, em Belo Horizonte, estão cerca de 150 tambores, que ocupam um volume de 30 m^3 o que resultou numa atividade de 100 TBq.*
- No Instituto de Engenharia Nuclear, no Rio de Janeiro, há aproximadamente 35 tambores com volume de 7 m^3 .*
- Na Central Nuclear Angra I, onde estão armazenados os rejeitos de atividade baixa e média gerados na própria usina, estão cerca de 5.000 tambores de 200 ℓ totalizando 3.000 toneladas, aproximadamente, com volume de 1000 m^3 e atividade de 4,5 TBq.*

- No Complexo Industrial de Poços de Caldas, onde estão armazenados os rejeitos gerados na purificação de concentrados de urânio e tório, estão 12700 toneladas de um concentrado chamado Torta II, com volume de 7250 m³ e atividade de 120 TBq.*
- Nos depósitos da antiga Usina Santo Amaro, onde estão armazenados os rejeitos gerados na purificação de terras raras extraídas da monazita, estão 540 toneladas de Torta II, com volume de 325 m³ e atividade de 5 TBq, em São Paulo, 3500 toneladas e atividade de 30TBq em Botuxim (SP).*
- Os rejeitos decorrentes do acidente radiológico de Goiânia constituem-se em um caso particular, já definitivamente solucionado. Foi construído um repositório em Abadia de Goiás (GO) para receber cerca de 4.000 toneladas de rejeitos, com atividade de 40 TBq, que foram gerados na descontaminação das áreas atingidas pelo acidente. Os tambores contendo os rejeitos estão colocados dentro de blocos de concreto, cobertos com terra e vegetação, de modo a evitar seu contacto com a biosfera. Apesar dos riscos ambientais insignificantes associados à solução adotada, a Comissão Nacional de Energia Nuclear mantém um controle constante do repositório e do meio ambiente próximo ao local.*

Nas Figuras III.3 e III.4 tem-se uma visão geral do armazenamento de rejeitos radioativos em um repositório permanente do Brasil. Apesar de todos cuidados serem de fundamental importância na elaboração e implementação de um repositório permanente, ainda se faz necessário um monitoramento constante nessas áreas, de tal maneira que este não represente um risco às populações humanas. A metodologia proposta se enquadra dessa maneira, no monitoramento e no controle dessas regiões, de forma a favorecer o controle dessas áreas, através do biomonitoramento.

* (Fonte: <http://www.ipen.br>)

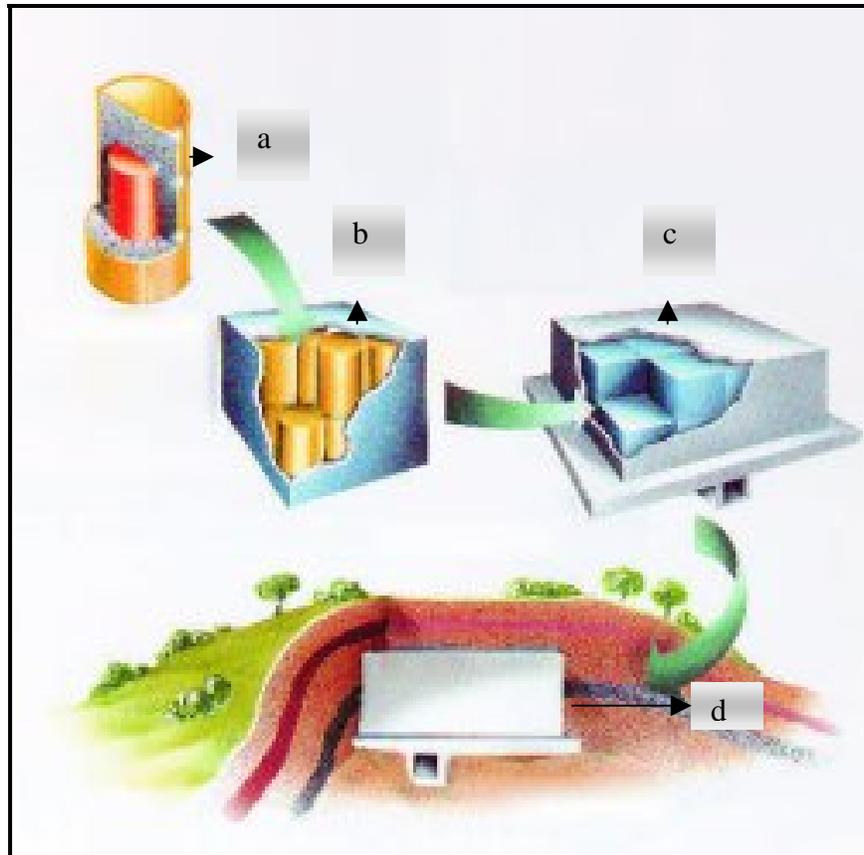


Figura III.3 – Esquema de armazenamento em um depósito permanente. *(a)* temos o confinamento do rejeito radioativo em tambores; *(b)* vários tambores são colocados envoltos em um bloco de concreto; *(c)* camada mais espessa de concreto sobre todos os blocos e em *(b)* lacrados; *(d)* camadas de terra e vegetação sobre a camada de concreto em *(c)*.



Figura III.4: Repositório da Abadia de Goiás (GO)

III.4. Efeitos Biológicos das Radiações

A radiação pode causar a ionização dos átomos, afetando as moléculas, células, tecidos, órgãos e até todo o corpo. As células, quando expostas à radiação ionizante, sofrem a ação de fenômenos físicos, químicos e biológicos. Assim, é de suma importância avaliar os efeitos da radiação sobre elas. O corpo humano é constituído de cerca de 5×10^{12} células, muitas das quais altamente especializadas para o desempenho de determinadas funções. Quanto maior o grau de especialização, isto é, quanto mais diferenciada for à célula, mais lentamente ela se dividirá. Uma exceção significativa a essa lei geral é dada pelos linfócitos, que, embora só se dividam em condições excepcionais, são extremamente radiosensíveis. A Figura III.5 mostra a comparação da radiosensibilidade de alguns seres vivos, em função da dose letal aguda recebida.

Um organismo complexo, quando exposto às radiações, está sujeito aos efeitos somáticos, que lhe são restritos, e aos genéticos, transmissíveis às gerações posteriores.

Os fenômenos físicos que intervêm são a ionização e/ou excitação dos átomos, os quais são responsáveis pelo compartilhamento da energia da radiação entre as células. Os fenômenos químicos sucedem aos físicos e provocam rupturas das ligações entre os átomos, formando radicais livres, num intervalo de tempo muito pequeno. Os fenômenos biológicos da radiação são uma consequência dos fenômenos físicos e químicos. Eles constituem as primeiras reações do organismo à ação das radiações, inclusive, para doses relativamente baixas. Além dessas alterações funcionais, os efeitos biológicos caracterizam-se também pelas variações morfológicas. Entendem-se como variações morfológicas, aquelas alterações em certas funções essenciais ou a morte imediata da célula, isto é, dano na estrutura celular. Assim, as funções metabólicas podem ser modificadas, a ponto da célula perder sua capacidade de efetuar as sínteses necessárias à sua sobrevivência.

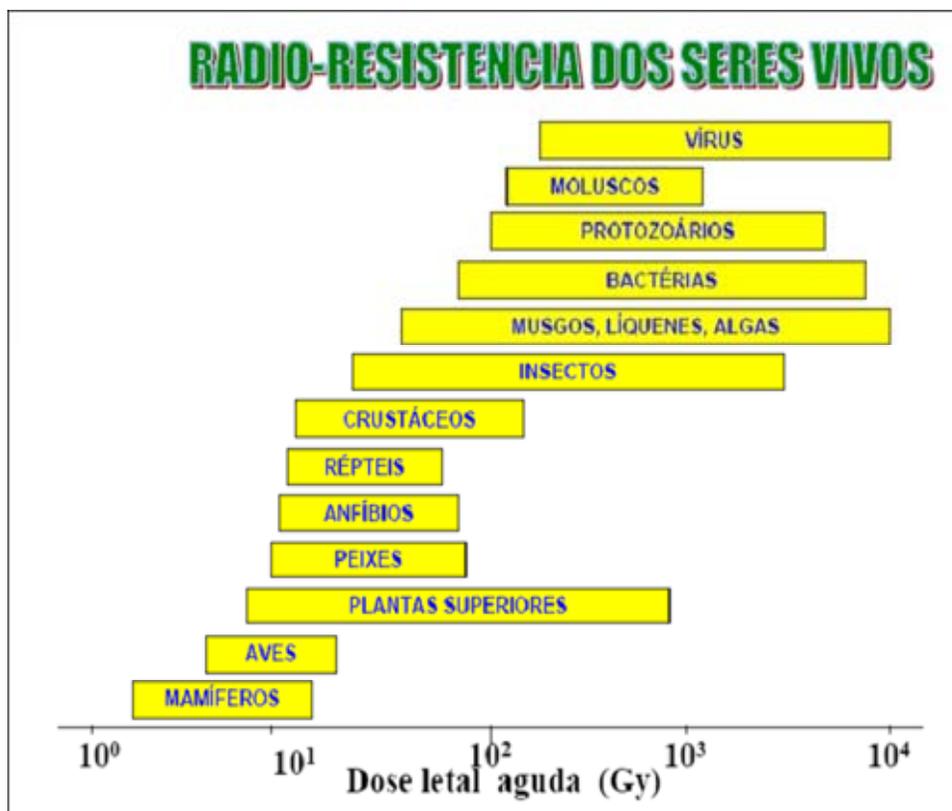


Figura III.5 Esquema experimental da radiosensibilidade de alguns seres vivos.

As células vivas podem ser classificadas segundo suas taxas de multiplicação, que também indicam sua relativa sensibilidade à radiação. Isso significa que diferentes sistemas celulares têm sensibilidades diferentes, tais como:

- Os linfócitos (glóbulos brancos) e as células que produzem sangue estão em constante reprodução e são as mais sensíveis.
- As células reprodutivas e gastrintestinais não se replicam tão rapidamente e, portanto, são menos sensíveis.
- As células nervosas e musculares são, nesse caso, as mais lentas e, portanto, as menos sensíveis.

Por outro lado, algumas células têm uma incrível capacidade de reparar esses danos. Por isso, nem todos os efeitos da radiação são irreversíveis. Em muitos casos, as células são capazes de reparar um determinado dano e de funcionar normalmente. Em alguns casos, no entanto, o dano é severo levando à morte celular. Em outros casos, a célula pode ser danificada e, ainda que consiga se reproduzir, suas células filhas terão falta de algum componente e morrerão. Finalmente, a célula pode ser afetada de tal forma que não morre, mas é modificada. As células modificadas se reproduzem e perpetuam a mutação, o que poderá significar o começo de um tumor maligno. O esquema apresentado na Figura III.6 resume os diversos comportamentos biológicos, quando células são afetadas por radiações ionizantes.

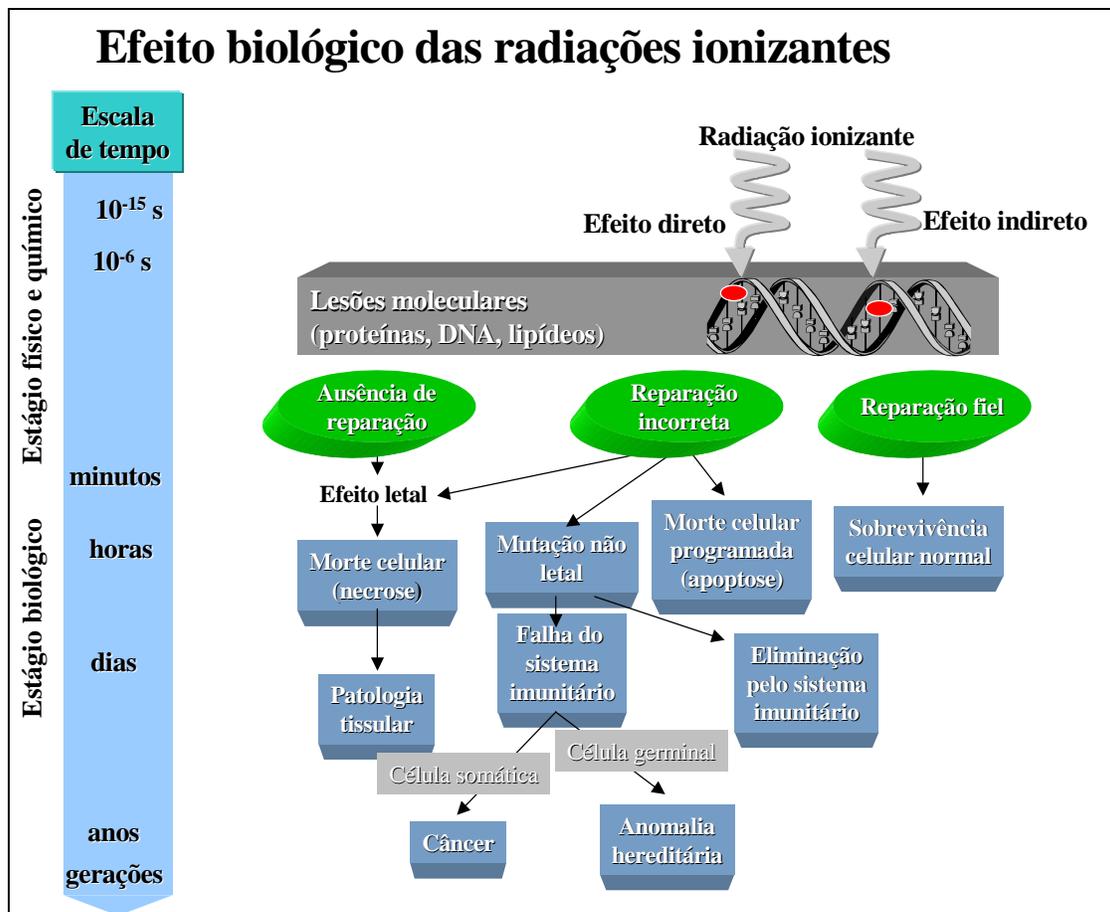


Figura III.6 Esquema dos efeitos biológicos da radiação ionizante.

Pela Figura III.7, observa-se que os efeitos somáticos classificam-se em imediatos e retardados, em função de um intervalo de tempo convencionalizado como sendo de 60 dias. O mais importante dos efeitos imediatos das radiações, após exposição do corpo inteiro a doses relativamente elevadas, é a Síndrome Aguda de Radiação (SAR). O efeito retardado de maior relevância é a cancerização radioinduzida, que só aparece vários anos após a irradiação. Curva de resposta da probabilidade de Indução ao câncer em função da dose absorvida é expressa por $p = \alpha_L D + \alpha_I D^2$, onde α_L é a inclinação da reta de ajuste para altas doses e α_I é a inclinação da reta de ajuste para baixas doses.

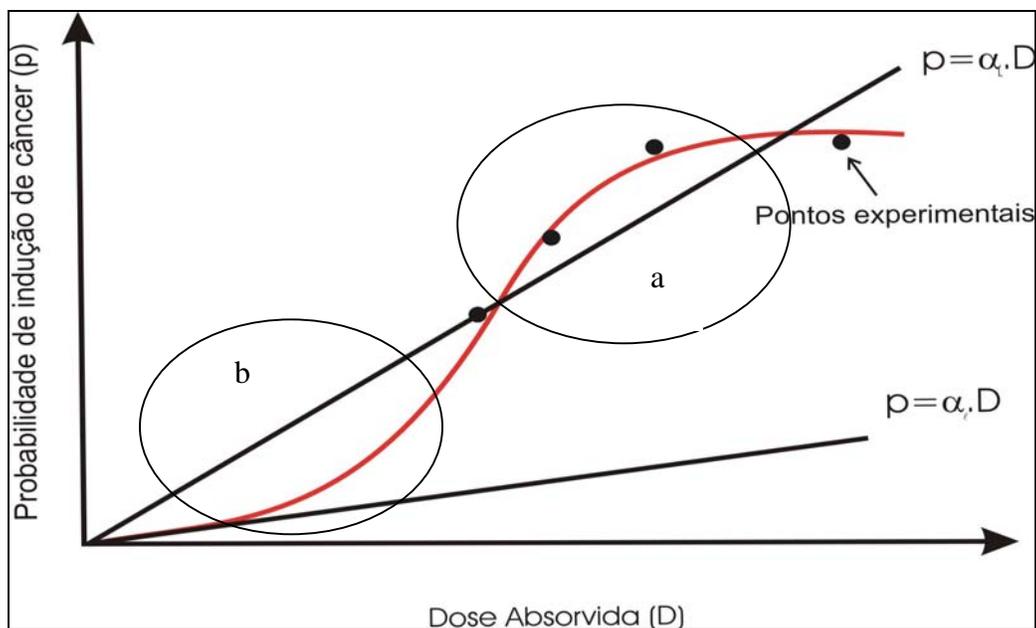


Figura III.7 – Probabilidade de indução ao câncer em função da dose absorvida: (a) efeitos Imediatos e exposições a altas doses (efeitos determinísticos); (b) para efeitos em longo prazo e exposições a baixas doses, podendo causar câncer e danos hereditários (efeitos probabilísticos).

Para se quantificar a radiação utilizam-se três tipos de grandezas dosimétricas: exposição, dose absorvida e dose equivalente.

A exposição representa o poder de ionização da radiação no ar e pode ser medida por uma câmara de ionização. A exposição é utilizada para descrever, por exemplo: a radiação de uma ampola radiográfica a uma determinada distância. A unidade de exposição no sistema Internacional (S.I.) é o Coulomb por quilograma (C/kg). O Roentgen (R) era a unidade utilizada, mas que ainda é referida com frequência em muitos documentos, sendo 1 R, correspondente a $2,58 \times 10^{-4} \text{C/kg}$.

A dose absorvida utilizada para descrever a quantidade de radiação absorvida por um organismo vivo pode ser definida pela energia, medida em Joules (J), depositada por unidade de massa (kg) no decurso da exposição. A unidade no S.I. é o Gray (Gy), onde

1Gy corresponde a 1J/kg. Anteriormente, a unidade utilizada era o rad, sendo 1 Gy equivalente a 100 rad. Doses muito elevadas, da ordem de centenas de Grays, provocam a morte em poucos minutos, possivelmente em decorrência da destruição de macromoléculas e de estruturas celulares indispensáveis à manutenção de processos vitais. Doses da ordem 10^1 Gy acarretam a síndrome hematopoiética, decorrente da inativação das células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas) e, principalmente, dos tecidos responsáveis pela produção dessas células (medula óssea)(Jaworowski, 1997; Kondo,1993).

Para uma mesma quantidade de radiação, os efeitos biológicos resultantes podem ser muito diferentes. Assim, se, ao invés de fracionada, a dose aplicada num paciente em tratamento de câncer fosse dada de uma vez, a probabilidade de morte seria muito grande, ou seja, o percentual de sobrevivência de células, quando irradiadas de uma só vez, é muito pequeno. Na esterilização de frutas, especiarias, peixes e carnes, com radiação γ , as doses aplicadas atingem 0,3 kGy. Em radioterapia, a dose atinge 2 Gy por aplicação. São feixes intensos e capazes de induzir à morte uma pessoa, se aplicados de uma única vez no corpo todo. Em radiologia, os feixes atingem alguns miligrays e não devem ser recebidos por uma pessoa com muita frequência. A radioatividade natural induz no homem doses de radiação de 1 mGy em 1 ano.

Inquestionavelmente, as radiações ionizantes são agentes mutagênicos, conclusão essa válida para as espécies animais e vegetais, com base nos resultados obtidos ao longo de seis décadas de experimentação. Na espécie humana, a detecção de tais alterações é bastante difícil. Mesmo entre os sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki, a maior população irradiada até hoje e também a mais intensamente estudada, a ocorrência de mutações radioinduzidas não foi satisfatoriamente demonstrada (IAEA,1992).

Para valores muito baixos de doses, da ordem de mGy, não existem estudos epidemiológicos suficientes para estabelecer, com segurança, o formato da curva dose/resposta ou a existência de um limiar de dose, por isso, supõe-se que a probabilidade de incidência de câncer seja proporcional à dose absorvida. Porém, a falta de respaldo científico vem sendo questionada, ao longo dos anos, existindo, hoje, a necessidade de

experimentos científicos para se avaliar o efeito das baixas doses de radiação e se desmistificar a questão dose/efeito.

A dose equivalente H é definida e expressa por $H_T = D_T W_r$, onde D_T é a dose absorvida média no órgão ou tecido e W_r é o fator de ponderação da radiação. A unidade no sistema internacional é o Joule por quilograma, denominada Sievert (Sv).

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 Seleção do bioindicador

Em princípio, seria utilizada somente a *Tradescantia clone 4430*, para ensaios Trad-SHM e para ensaios Trad-MCN. Durante o desenvolvimento da tese de mestrado (Santos, 2001), uma limitação foi detectada em decorrência da suscetibilidade do clone 4430 às influências do clima tropical (temperatura, umidade e chuva), que se manifestam pela inibição de seu crescimento e florescimento. Além disso, quando mantida ao ar livre por períodos prolongados de tempo, a *Tradescantia clone 4430* é atacada freqüentemente por parasitas e insetos, o que tornou seu uso também limitado a determinadas regiões com clima mais ameno. Somente um ensaio foi realizado anteriormente, na região de Poços de Caldas, MG, que é o local próximo ao local de cultivo estando sob as mesmas condições climáticas em que são cultivadas.

Para se desenvolver o estudo em regiões de clima quente, procurou-se um bioindicador similar, que se adaptasse às condições ambientais variadas encontradas no Brasil. Optou-se por uma planta de mesma família das Comelináceas, a *Tradescantia Pallida* (Rosa) Hunt. Var. *purpúrea* Boom (Sumita, 2003), facilmente encontrada nas ruas e jardins de várias cidades do país, que pode ser observada nas Figuras IV.1 (detalhe) e IV.2. Essas espécies são tetrapóides, com resistência notável a parasitas e insetos, propagando-se facilmente, através de estacas. Florescem o ano todo e têm poucas exigências de crescimento. A *Tradescantia Pallida*, somente pode ser utilizada como bioindicador para avaliação do impacto das radiações ionizantes em análise pelo método Trad-MCN; por não possuírem pêlos estaminais, o ensaio Trad-SHM não pode ser realizado.



Figura IV.1 – Fotografia de uma flor da *Tradescantia Pallida* (Rose) var. *Purp.*

Para fins de comprovação de uso para biomonitoramento e estudo de mutagêneses a baixas taxas de doses de radiação, foram comparadas as respostas de dose-efeito fornecidas pela *Tradescantia* clone 4430 e *Tradescantia Pallida*, objetivando-se relacionar a sensibilidade de ambas, para um modelo bem definido de dano ambiental. Concluiu-se que essas espécies de *Tradescantia* são igualmente sensíveis às doses de raios-X (10 a 50 cGy). Esses resultados reforçaram a possibilidade da utilização da *T. Pallida* em estudos de mutagenicidade ambiental (Suyama *et al*, 2002; Sumita *et al*, 2003).

IV.2 Delineamento Experimental

IV.2.1. Ensaio realizado com a *Tradescantia* clone 4430.

O experimento foi desenvolvido na Coordenação de Laboratório de Poços de Caldas - COLAB, em um depósito de minério, a Caldasita, que agora faz parte do ambiente natural ao redor do laboratório. A COLAB é uma unidade da Comissão Nacional de Energia Nuclear, CNEN, com faculdade de unidade administrativa ou gestora, vinculada e

subordinada à superintendência de licenciamento e controle da diretoria de radioproteção e segurança nuclear, instalada em zona do município de Poços de Caldas – Minas Gerais.

O laboratório, especializado no desenvolvimento e otimização de processos de beneficiamento de minérios de urânios e/ou tório, assim como de minérios aos quais os dois radionuclídeos (e respectivas famílias) se encontram associados, dispõem, como resultados de suas atividades, de diferentes fontes de radiação, na forma de frações minerais e de rejeitos de processo, neste contexto, encontram-se lá, armazenados, a Caldasita e a Torta II. A Caldasita foi beneficiada na COLAB até 1961, é proveniente da região de Poços de Caldas, sendo um minério rico em zircônio ao qual se encontram associados urânio e tório. A Torta II é um subproduto do beneficiamento da monazita que, por sua vez, é um mineral obtido a partir do beneficiamento físico das areias monazíticas. A monazita é beneficiada para a obtenção de elementos terras raras, utilizadas em tecnologias de ponta como cerâmicas e semicondutores. por apresentar teores significativos de urânio e de tório, a Torta II é classificada como material estratégico e como tal é armazenada em depósitos, aguardando processamento para a retirada do urânio e do tório.

Por incorporarem, na sua composição química, urânio e tório, a Caldasita e a Torta II foram utilizadas, no experimento aqui conduzido, para simular um aumento da radioatividade ambiental.

Os urânio 238 e 235 assim como o tório-232 são os únicos elementos radioativos que ainda permanecem na natureza, na forma em que se encontravam, desde o início dos tempos. com desintegração de seus núcleos, cada um dá origem a uma das séries de elementos radioativos com as quais os seres vivos convivem, desde o surgimento na terra. Nas figuras IV.2, IV.3 são apresentadas, respectivamente, as série do urânio-238 e o tório-232, que mais contribuem para a radioatividade ambiental. Dentre as informações contidas em cada uma delas estão: a meia vida dos dois elementos pais das séries, seus filhos, as meias vidas de cada um. Mostram a existência de radionuclídeos com meia vida extremamente curta e de outros cujas meias-vidas são bem mais longas; mostra que as desintegrações nucleares podem ocorrer por emissão de partículas: alfas (dois prótons e dois nêutrons) e partículas beta (elétrons de alta velocidade) e que, com a emissão dessas partículas, um núcleo que se desintegra dá origem a um outro núcleo e, conseqüentemente, a um novo elemento químico, com novas propriedades físicas e químicas que, por sua vez, lhes confere um novo comportamento frente ao meio ambiente. Estes, com o objetivo de

alcançar uma configuração energeticamente estável, núcleos radioativos emitem radiações gama (radiação eletromagnética) de diferentes energias, porém, características de cada tipo de núcleo que se desintegre.

Série do urânio — $4n + 2$		
ELEMENTO NOME — A_Z SÍMBOLO	PERÍODO DE MEIA-VIDA (P)	EQUAÇÃO DE DECAIMENTO E PARTÍCULA EMITIDA
Urânio ${}^{238}_{92}\text{U}$	$4,51 \cdot 10^9$ anos	${}^{238}_{92}\text{U} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{234}_{90}\text{Th}$
Tório ${}^{234}_{90}\text{Th}$	24,10 dias	${}^{234}_{90}\text{Th} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{234}_{91}\text{Pa}$
Protactínio ${}^{234}_{91}\text{Pa}$	1,17 minuto	${}^{234}_{91}\text{Pa} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{234}_{92}\text{U}$
Urânio ${}^{234}_{92}\text{U}$	$2,47 \cdot 10^5$ anos	${}^{234}_{92}\text{U} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{230}_{90}\text{Th}$
Tório ${}^{230}_{90}\text{Th}$	$8,0 \cdot 10^4$ anos	${}^{230}_{90}\text{Th} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{226}_{88}\text{Ra}$
Rádio ${}^{226}_{88}\text{Ra}$	1 620 anos	${}^{226}_{88}\text{Ra} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{222}_{86}\text{Rn}$
Radônio ${}^{222}_{86}\text{Rn}$	3,823 dias	${}^{222}_{86}\text{Rn} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{218}_{84}\text{Po}$
I) Polônio ${}^{218}_{84}\text{Po}$	3,05 minutos	${}^{218}_{84}\text{Po} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{218}_{85}\text{At}$
II) Polônio ${}^{218}_{84}\text{Po}$		${}^{218}_{84}\text{Po} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{214}_{82}\text{Pb}$
Astato ${}^{218}_{85}\text{At}$	≈ 2 segundos	${}^{218}_{85}\text{At} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{214}_{83}\text{Bi}$
Chumbo ${}^{214}_{82}\text{Pb}$	26,8 minutos	${}^{214}_{82}\text{Pb} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{214}_{83}\text{Bi}$
I) Bismuto ${}^{214}_{83}\text{Bi}$	19,7 minutos	${}^{214}_{83}\text{Bi} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{214}_{84}\text{Po}$
II) Bismuto ${}^{214}_{83}\text{Bi}$		${}^{214}_{83}\text{Bi} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{210}_{81}\text{Tl}$
Polônio ${}^{214}_{84}\text{Po}$	$1,64 \cdot 10^{-4}$ segundo	${}^{214}_{84}\text{Po} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{210}_{82}\text{Pb}$
Tálio ${}^{210}_{81}\text{Tl}$	1,3 minuto	${}^{210}_{81}\text{Tl} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{210}_{82}\text{Pb}$
Chumbo ${}^{210}_{82}\text{Pb}$	21 anos	${}^{210}_{82}\text{Pb} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{210}_{83}\text{Bi}$
I) Bismuto ${}^{210}_{83}\text{Bi}$	5,01 dias	${}^{210}_{83}\text{Bi} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{210}_{84}\text{Po}$
II) Bismuto ${}^{210}_{83}\text{Bi}$		${}^{210}_{83}\text{Bi} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{206}_{81}\text{Tl}$
Polônio ${}^{210}_{84}\text{Po}$	138,40 dias	${}^{210}_{84}\text{Po} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{206}_{82}\text{Pb}$
Tálio ${}^{206}_{81}\text{Tl}$	4,19 minutos	${}^{206}_{81}\text{Tl} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{206}_{82}\text{Pb}$
Chumbo ${}^{206}_{82}\text{Pb}$	estável	—

Figura IV.2 – Série do Urânio-238.

Série do Tório — 4n		
ELEMENTO NOME — SÍMBOLO	PERÍODO DE MEIA-VIDA (P)	EQUAÇÃO DE DECAIMENTO E PARTÍCULA EMITIDA
Tório ${}^{232}_{90}\text{Th}$	$1,41 \cdot 10^{10}$ anos	${}^{232}_{90}\text{Th} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{228}_{88}\text{Ra}$
Rádio ${}^{228}_{88}\text{Ra}$	$5,77 \pm 0,02$ anos	${}^{228}_{88}\text{Ra} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{228}_{89}\text{Ac}$
Actínio ${}^{228}_{89}\text{Ac}$	6,13 horas	${}^{228}_{89}\text{Ac} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{228}_{90}\text{Th}$
Tório ${}^{228}_{90}\text{Th}$	1,913 ano	${}^{228}_{90}\text{Th} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{224}_{88}\text{Ra}$
Rádio ${}^{224}_{88}\text{Ra}$	3,64 dias	${}^{224}_{88}\text{Ra} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{220}_{86}\text{Rn}$
Radônio ${}^{220}_{86}\text{Rn}$	55 segundos	${}^{220}_{86}\text{Rn} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{216}_{84}\text{Po}$
I) Polônio ${}^{216}_{84}\text{Po}$	0,15 segundo	${}^{216}_{84}\text{Po} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{216}_{85}\text{At}$
II) Polônio ${}^{216}_{84}\text{Po}$		${}^{216}_{84}\text{Po} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{212}_{82}\text{Pb}$
Astato ${}^{216}_{85}\text{At}$	$\approx 3 \cdot 10^{-4}$ segundo	${}^{216}_{85}\text{At} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{212}_{83}\text{Bi}$
Chumbo ${}^{212}_{82}\text{Pb}$	10,64 horas	${}^{212}_{82}\text{Pb} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{212}_{83}\text{Bi}$
I) Bismuto ${}^{212}_{83}\text{Bi}$	60,6 minutos	${}^{212}_{83}\text{Bi} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{212}_{84}\text{Po}$
II) Bismuto ${}^{212}_{83}\text{Bi}$		${}^{212}_{83}\text{Bi} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{208}_{81}\text{Tl}$
Polônio ${}^{212}_{84}\text{Po}$	$3,04 \cdot 10^{-7}$ segundo	${}^{212}_{84}\text{Po} \rightarrow {}^4_2\alpha + {}^{208}_{82}\text{Pb}$
Tálio ${}^{208}_{81}\text{Tl}$	3,1 minutos	${}^{208}_{81}\text{Tl} \rightarrow {}^0_{-1}\beta + {}^{208}_{82}\text{Pb}$
Chumbo ${}^{208}_{82}\text{Pb}$	estável	—

Figura IV.3 – Série do Tório-232

Radiações alfa, beta e gama são radiações ionizantes que ao interagirem com a matéria, transferem para átomos e moléculas do meio atingido a energia a elas incorporadas no processo de desintegração nuclear. a transferência se dá entre a radiação ionizante e os elétrons dos átomos e moléculas por ela atingidos. O processo dá origem a um par de íons que deverá interagir quimicamente com moléculas do meio de modo a restabelecer o equilíbrio elétrico perdido em decorrência da ação da radiação.

IV.2.1.1. Seleção dos locais / taxas de dose

Com o auxílio de um detector PCN7013 polon – Radiation Monitor Controller Model 9015 – radical foi inicialmente localizada uma área na qual a taxa de exposição correspondia a 0,84 $\mu\text{Gy/h}$ isto é, igual à taxa na qual se encontra exposto o estoque de *tradescantia* mantido na casa de vegetação da COLAB. Na mesma região e exposta às mesmas condições microclimáticas, foi selecionada outra área, rica em caldasita, cuja taxa de exposição era de 13,1 $\mu\text{Gy/h}$. um terceiro ponto, apresentando 39,4 $\mu\text{Gy/h}$ foi obtido com o aporte de bombonas de Torta II. Os três locais diferenciavam-se apenas pelo nível de radioatividade pontual. Cada um dos pontos experimentais foi cercado por uma cerca com 1,80 cm de altura de modo a evitar que as plantas fossem danificadas por animais. Antes do início do experimento um novo levantamento das taxas de exposição foi realizado em cada um dos locais selecionados, quando as taxas foram confirmadas.

Neste trabalho foi utilizado o clone BNL 4430 da *Tradescantia*, originário do Brookhaven National Laboratory- EUA, que foram trazidas para a COLAB por Geraldo Stachetti Rodrigues, da Embrapa, e foram mantidas desde então em condições climáticas controladas, na Casa de Vegetação, na COLAB, sob supervisão técnica e cuidados especiais.

IV.2.1.2. Determinação das frequências de mutação

O experimento teve a duração de 28 dias, durante os quais as plantas foram mantidas nas condições experimentais que simulavam aumentos do nível da radioatividade natural. Com exceção dos diferentes níveis de “radioatividade natural”, os demais itens, passíveis de influenciar o resultado do experimento, foram comuns a todos os vasos: mesmo recipiente, solo proveniente de mesma origem, exposição às mesmas variações microclimáticas, regimes de rega e de adubagem, comuns.

Com o objetivo de garantir um número mínimo de flores por dia e por ponto experimental, em cada local selecionado para a realização do experimento foram distribuídos 18 vasos contendo exemplares adultos de *Tradescantia* (Figura IV.4.a). Os vasos permaneceram expostos por 21 dias sendo que a determinação da frequência de eventos mutacionais foi executada num total de 28 dias sequenciais, de modo a contabilizar três semanas de exposição contínua.

Diariamente e a partir do primeiro dia de exposição, foram coletadas, logo após a sua abertura, trinta flores, dez de cada grupo. As flores eram colocadas em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido em água; eram conservadas em baixa temperatura até o momento de sua análise. A contagem de eventos “rosa” era efetuada por dois técnicos, para confirmação do número de pêlos e o número de eventos.

Com uma pinça de ponta fina um estame é removido da flor e depositado em uma pequena gota de óleo de parafina ou de óleo mineral. O todo permanece sobre uma lâmina de vidro que é analisada em lupa. À temperatura ambiente e com o calor da iluminação da lupa, as células rapidamente sofrem plasmólise; para evitar a perda de material, os estames são analisados individualmente enquanto as flores permanecem em baixa temperatura (em geladeira ou em isopor com gelo). As contagens foram feitas em cinco flores de cada vez.

O estame é mergulhado no óleo (Figura IV.4.b). Com o auxílio da ponta da agulha de uma seringa, os pêlos estaminais são ordenados (penteados). Não deve haver nem escassez e nem excesso de óleo; caso contrário, os pêlos não permanecerão no lugar.

Inicialmente contava-se o número de pêlos e, a seguir, o número de células rosas existente no conjunto de células azuis que constituem os pêlos estaminais (ou eventos mutacionais). Caso encontrado um pêlo com duas células rosa entre células azuis, ou um pêlo todo constituído por células rosa, considerava-se o observado como sendo a evidência de um único evento mutacional (Figura IV.5). Se um determinado pêlo apresentasse alternância de células azuis e rosas, o número de mutações corresponderia ao número de alternâncias observadas, uma vez que essas correspondem a eventos independentes.

A cada dia, 10 flores de cada um dos grupos experimentais eram coletadas e analisadas, conforme metodologia descrita acima, perfazendo um total de 4.200 pêlos analisados e 126.000 células observadas por ponto experimental, por dia.

As frequências de mutações refletem o potencial mutagênico em pré-exposição (plantas mantidas na casa de vegetação sob controle). A influência das condições devem ser observadas, a partir do oitavo dia de exposição, conforme descrita na Tabela IV.1.

Tabela IV.1: Condições experimentais

Grupo Experimental	Condições Prévias	Condições Experimentais
Grupo A	Mantida na casa de vegetação Taxa de exposição: 1,6 $\mu\text{R}/\text{min}$	Mantida no Campo Taxa de exposição: 1,6 $\mu\text{R}/\text{min}$
Grupo B	Mantida na casa de vegetação Taxa de exposição: 1,6 $\mu\text{R}/\text{min}$	Mantida no Campo Taxa de exposição: 25 $\mu\text{R}/\text{min}$
Grupo C	Mantida na casa de vegetação Taxa de exposição: 1,6 $\mu\text{R}/\text{min}$	Mantida no Campo Taxa de exposição: 75 $\mu\text{R}/\text{min}$



Figura IV.4 – (a) Flor da *Tradescantia*; (b) as células dos pêlos estaminais

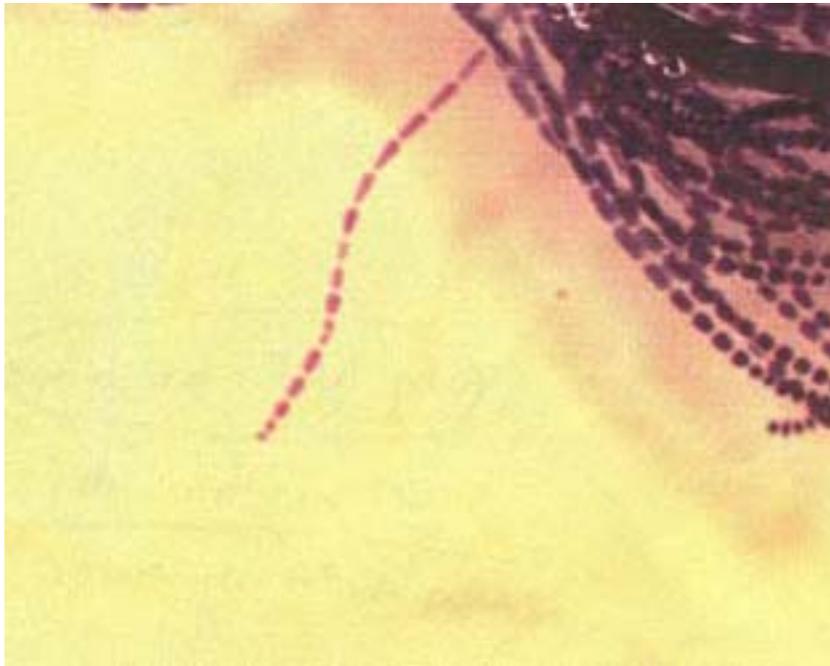


Figura IV.5 – Pêlo estaminal da *Tradescantia*.

IV.2.2. Ensaio realizado com a *Tradescantia Pallida*.

Justificada a possibilidade da utilização da espécie *Tradescantia Pallida*, pela comunidade científica, através de artigos publicados em periódicos internacionais (Suyama *et al*, 2002; Sumita *et al*, 2003), procedeu-se, então, ao cultivo da espécie. Essas foram cultivadas nos jardins do campus da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em local arejado, dotado de boa luminosidade. As plantas eram regadas duas vezes por semana, estando sob a temperatura ambiental média de 23°C, onde a taxa de dose medida é de 0,26μGy/h, fornecida pelo monitor de radiação, MRA GP500, modelo 7237/03-44. O cultivo do bioindicador foi controlado por dois jardineiros. A Figura IV.6 mostra as amostras da *Tradescantia Pallida* cultivadas nos jardins da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.



Figura IV.6 – Visão das estacas de *Tradescantia Pallida* para propagação.

IV.2.2.1. Seleção dos Locais de amostragens.

O rejeito radioativo pode ser classificado em categorias distintas: rejeitos de baixa, média ou alta atividade, quanto ao nível de radioatividade, e, de curta, média ou longa duração, quanto ao tempo de vida. Por exemplo, no processamento do minério de urânio, são produzidos resíduos de baixa atividade, mas de longa duração; materiais e equipamentos que foram expostos à radiação durante a operação das instalações nucleares, como luvas, panos de limpeza, plásticos e vestimentas de proteção, são de baixa atividade e curta duração. Os rejeitos de baixa e média radioatividade são compactados dentro de tambores de aço. Esses rejeitos são armazenados em depósitos. O depósito da Usina de Angra está sob a custódia da Eletronuclear, sendo considerado um depósito inicial, sob a supervisão da CNEN. Os depósitos de rejeitos radioativos do IEN e do IPEN são considerados intermediários, obedecendo a critérios, procedimentos e normas estabelecidas pela CNEN (CNEN-NN 6.09, 2002). Estes depósitos são destinados a receber e acondicionar os rejeitos radioativos, objetivando a sua futura reutilização ou remoção para um depósito final.

O depósito final da Abadia de Goiás, também designado repositório, é o único no País. Ele foi destinado a armazenar os resíduos e rejeitos provenientes do acidente com o Césio-137. A seleção e a escolha do local para um repositório tem a participação de diferentes especialistas necessários ao desenvolvimento de atividades em: Geologia; Hidrografia; Ecologia; Biologia; Química; Física; Meteorologia, além de uma assessoria jurídica. O processo da escolha do local deve obedecer a uma análise técnica em forma seletiva seqüencial, compreendendo diversos níveis de detalhamento de dados e informações, as quais devem estar de acordo com as leis n^{os} 4.118/62 e 10.308/01 e as normas CNEN-NE 6.05, CNEN-NE 6.06 e CNEN-NN 6.09.

Este trabalho foi concentrado nos quatro depósitos acima citados: o depósito inicial da Usina Nuclear de Angra dos Reis; o da Abadia de Goiás (Acidente do Césio-137, em Goiânia), o único depósito final do Brasil e alvo de grande preocupação pela sociedade brasileira; o depósito intermediário do IPEN (em São Paulo), pela grande armazenagem de rejeitos; e o depósito intermediário do IEN (Rio de Janeiro) de pequeno porte.

IV.2.2.2. Descrição do Experimento.

Em cada depósito, foi feito inicialmente o levantamento radiométrico nas proximidades do DRR, com o monitor MRA GP500, modelo 7237/03-44, para a escolha dos pontos de exposição. Após a escolha dos pontos, foram colocadas jardineiras contendo plantas da *Tradescantia Pallida*, por um período de 24 horas. Após este período, é necessário um tempo de espera de 24 h para que as inflorescências sejam fixadas em solução de ácido acético e álcool, na proporção (1:3). Para as análises, utilizou-se, para a visualização e captação de imagens, o microscópico Nikon Eclipse E400 e a máquina fotográfica Pixera, juntamente com o software Adobe Photoshop, para o tratamento das imagens. A Figura IV.8 ilustra os equipamentos utilizados no Laboratório de Neutronografia em Tempo Real (LNRTR/COPPE/UFRJ).



Figura IV.7 – Fotografia do equipamento de aquisição de imagens do LNRTR/COPPE/UFRJ.

O primeiro passo foi à escolha dos pontos para a exposição do sistema bioindicador nos locais próximos aos depósitos. Através de avaliação radiométrica, três pontos foram selecionados em cada depósito. Um deles, o ponto de controle, foi escolhido por apresentar uma taxa de exposição mais próxima da taxa no local de cultivo. Uma vez selecionados os pontos, depositou-se nos pontos as jardineiras com as amostras de *Tradescantia Pallida*, plantadas e dotadas de inúmeras inflorescências, para garantir um mínimo de 3000 células em amostra por ponto na análise. Para isso, os caules devem ter de tamanho médio, as inflorescências pequenas e ainda fechadas. Nesta etapa as amostras permanecem no local por um período de 24 horas. Após a exposição, elas foram colocadas em água durante um período de 24 horas, período esse necessário para que o processo de meiose continuasse e as células mães e grãos de pólen atingissem a fase de tétrades (denominado período de recuperação), momento em que é possível se visualizar os

micronúcleos. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução de ácido acético e álcool, na proporção 1:3, por 24 horas (Ma, 1984). Na Figura IV.8, pode-se visualizar uma célula-mãe, na fase de tétrades.



Figura IV.8 - Foto da célula-mãe de grãos de pólen, com a formação de tétrades, em um aumento de 100x. Célula sem a presença de micronúcleos.

Na preparação das lâminas, deve-se selecionar uma inflorescência, retirar as anteras, amassar bem, adicionar uma gota de carmim e verificar se estas possuem tétrades. Caso não possua, descarta-se o broto e escolhe-se um novo. Caso possua, coloca-se uma lamínula em cima das células amassadas imersas no carmim e aperta-se levemente, para que todas possam ser vistas segundo o mesmo plano, no microscópio. Deve-se então aquecê-las com uma lamparina a 80° C, retirar a sujeira e, finalmente, selar a lamínula com esmalte. Com a ajuda do microscópio, inicia-se a contagem das células, em fase de tétrades. Deve-se contar 300 tétrades por lâmina. Utilizando-se uma tabela, é feita a contagem também por micronúcleo, em cada célula. A Figura IV.9 representa o processo de análise para a Trad-MCN, realizado em diversas fases, a saber: a) seleção do broto; b) dissecação da antera; c) amassamento das anteras; d) adição do carmim, a fim de colorir e melhor visualizar as células; nesta etapa, verifica-se a existência ou não de tétrades; e) após confirmação da existência de tétrades, coloca-se a lamínula e aperta-se-á

levemente; f) aquece-se um pouco a lâmina, para que possa ser visualizada em um plano; g) aperta-se novamente; e h) já é possível a aquisição da imagem, iniciando-se o processo de contagem. A Figura IV.10 representa o processo de meiose da inflorescência, onde é possível se visualizar o estágio de tétrades.

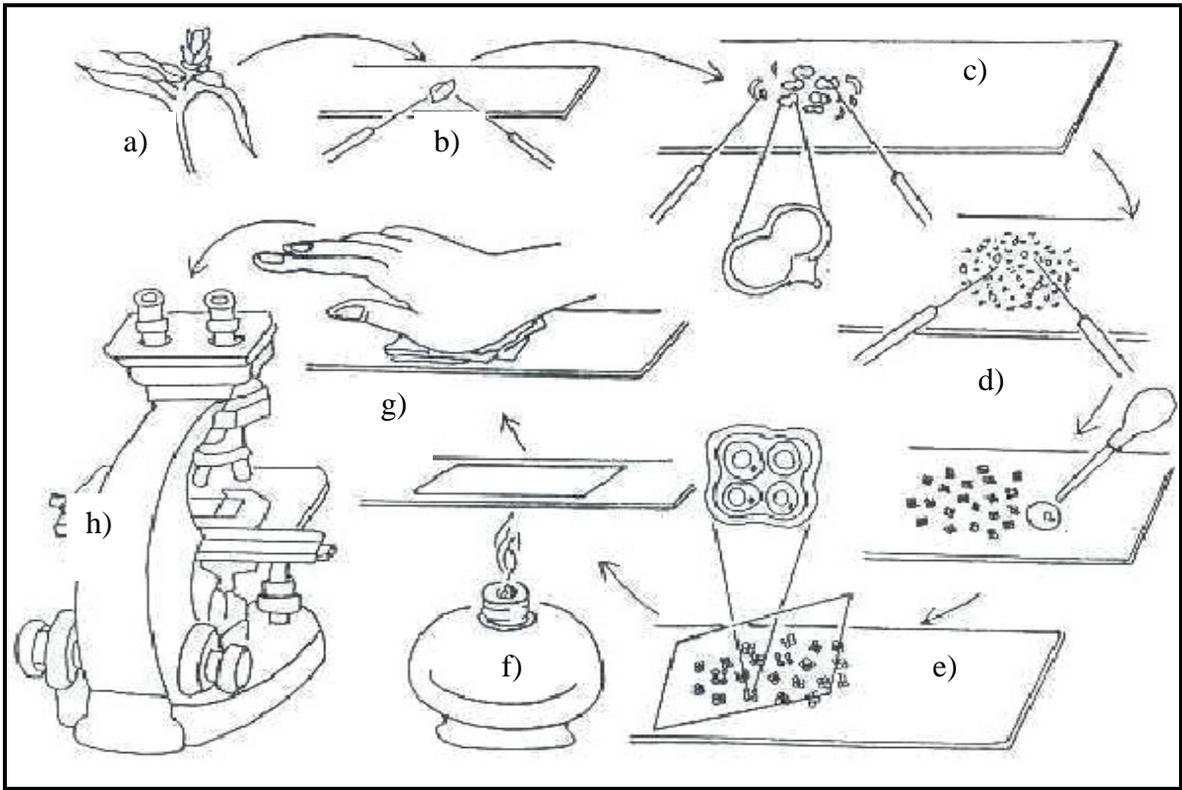


Figura IV.9 – Representação esquemática da metodologia de micronúcleos, no preparo da lâmina com células na fase de tétrades. (Ma,1981)

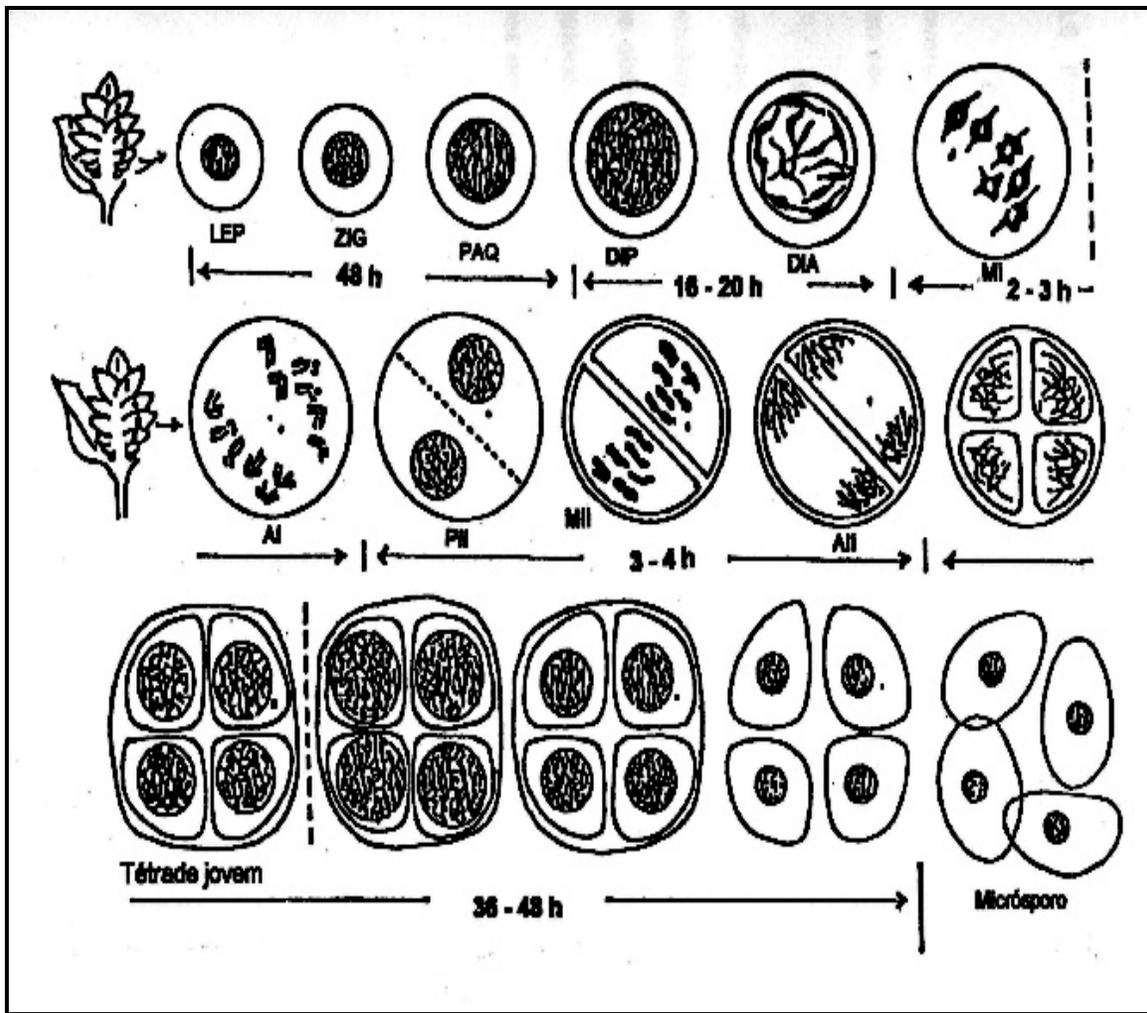


Figura IV.10 – Representação esquemática da duração e morfologia geral de cada estágio da meiose das células-mãe do grão de pólen de *Tradescantia* (Ma,1983)

Fixados os grupos, foi feita a análise, através da contagem de micronúcleos em cada lâmina, sendo quantificadas num total de 300 células por lâmina. A Figura IV.5 apresenta uma tetrade onde não se verifica a presença de micronúcleos. As Figuras IV.11 e IV.12, já ressaltam a presença de micronúcleos nas tétrades.

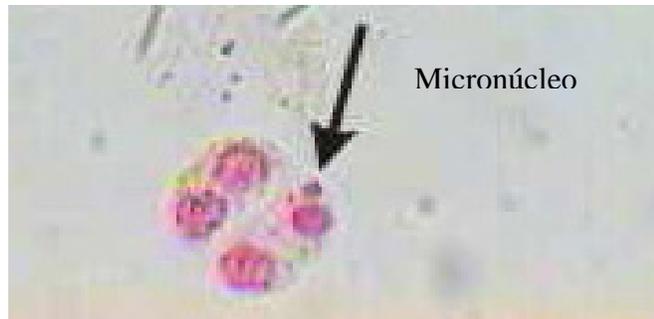


Figura IV.11. Imagem da célula-mãe de grãos de pólen, em fase de tétrades. Célula apresentando 1 micronúcleo.

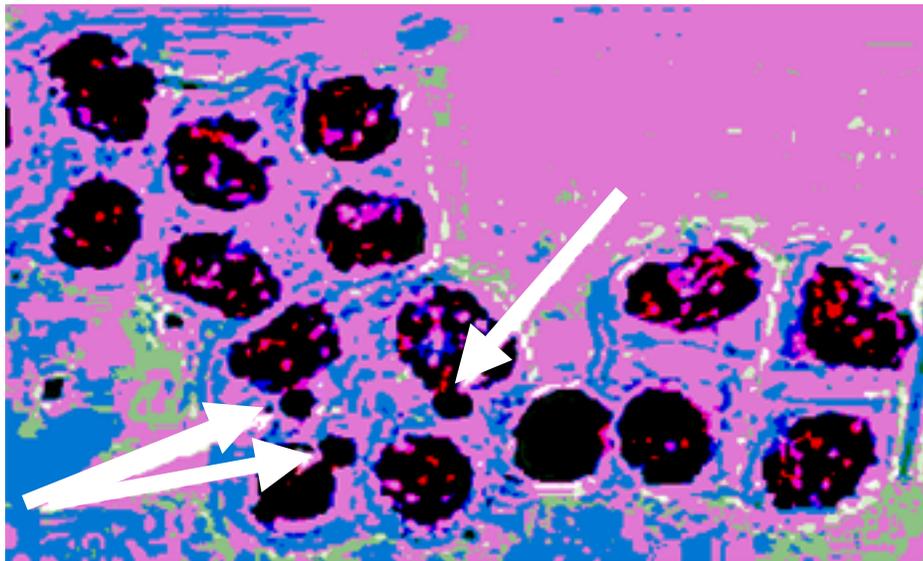


Figura IV.12. Imagem de células-mãe de grãos de pólen, em fase de tétrades, obtida com o microscópio óptico, sob um aumento de 100x. Célula apresentando 3 micronúcleos, assinalados por setas.

IV.2.2.3. Obtenção dos dados dos ensaios realizados nos DRR selecionados para exposição aguda (24 horas).

A Tabela abaixo mostra as taxas de dose resultantes em cada grupo e local selecionados.

Tabela IV.2 – Taxa de dose ($\mu\text{Gy/h}$) resultante de cada grupo e local selecionados.

<i>Local</i> \ <i>Grupos</i>	Co* ($\mu\text{Gy/h}$)	C1 ($\mu\text{Gy/h}$)	A ($\mu\text{Gy/h}$)	B ($\mu\text{Gy/h}$)
<i>IEN</i>	0,26	0,44	21,9	35,1
<i>UMA</i>	0,26	0,35	25,4	46,5
<i>IPEN</i>	0,26	0,44	30,0	137
<i>ABADIA</i>	0,26	0,26	2,2	3,1

*Co é o grupo controle no local de cultivo.

A Figura IV.13 representa o número de micronúcleos por 100 células analisadas, resultante da exposição do biosensor, que relaciona as taxas de dose aos efeitos mutacionais observados, em cada grupo e local selecionados.

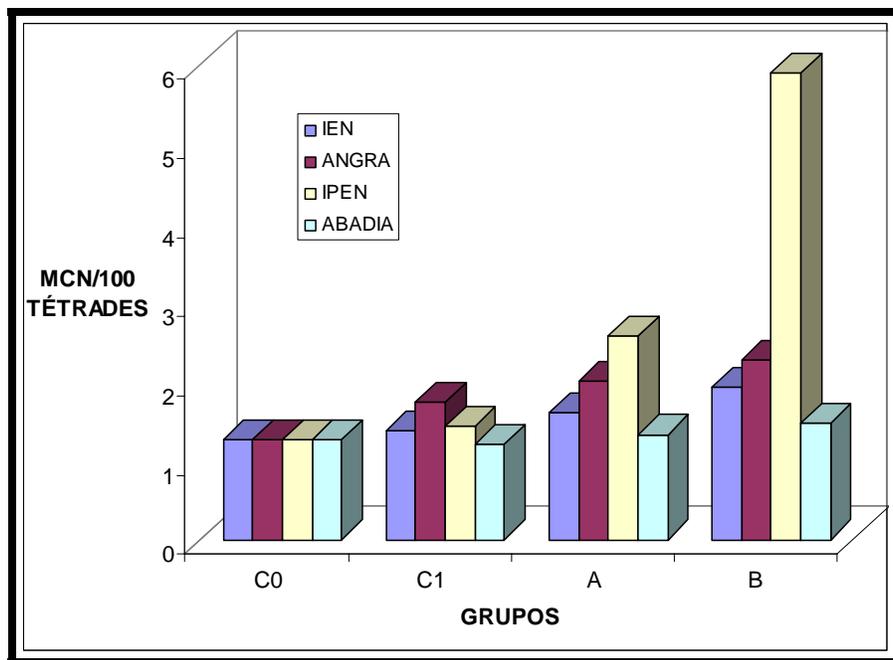


Figura IV.13 – Número de micronúcleos por 100 tétrades observadas, e locais selecionados.

IV.2.2.4. Comparação entre os grupos controles.

A fim de verificar se as plantas estavam sofrendo algum estresse devido ao transporte do local de cultivo ao local de exposição, foi realizada uma comparação entre todos os grupos controles.

IV.2.2.5. Curva mutagênica em função da taxa de dose.

Foi construída uma curva relacionando os resultados obtidos em função do percentual de micronúcleos em cada grupo de DRR e a taxa de dose encontrada.

IV.2.2.6. Comparação entre a frequência de MCN por célula analisada para os grupos A e B em cada DRR.

Para se observar à influência das taxas de dose em relação ao dano que esta poderia causar na célula, foi feita uma comparação entre o percentual de MCN encontrado em cada grupo A e B, dos DRR selecionados.

IV.2.2.7. Exposição Crônica.

Para verificar a influência da exposição às taxas de dose nas plantas por um período maior que 24 horas, foi realizado dois ensaios no DRR/IEN: o primeiro com uma exposição de 8 dias e depois por um período de 30 dias. Foram analisadas 20 amostras totalizando 24.000 células, cujas taxas eram no grupo controle 0,45 $\mu\text{Gy/h}$ e no grupo A, 40,0 $\mu\text{Gy/h}$.

IV.2.3 Análise Estatística.

Após realização dos ensaios e com a obtenção dos resultados, foram realizadas as análises estatísticas, baseadas na homogeneidade entre as amostras. Os testes envolvidos são o teste de variância, teste F e o teste entre as médias (t-student), obedecendo ao tratamento estatístico do protocolo de T.H. Ma *et al.*(1981).

TESTANDO A HOMOGENEIDADE DE DUAS AMOSTRAS: Teste de Variância e t-Student

Duas amostras são consideradas homogêneas quando apresentam, em relação ao caráter avaliado, as mesmas médias e as mesmas variâncias. A distribuição deve ser Normal assim como Normal é deve ser a distribuição do caráter analisado, na população de

origem. Assim sendo os três conjuntos de dados obtidos experimentalmente foram testados dois a dois.

A distribuição do t-Student define, com diferentes níveis de incerteza, se duas amostras pertencem ou não uma mesma população. Em outras palavras, se o caráter utilizado como parâmetro de avaliação da homogeneidade apresenta a mesma distribuição nas duas amostra cuja origem se quer testar. Para se determinar se a diferença entre duas variâncias é significativa, aplica-se o Teste **F**. Na comparação de duas variâncias o valor de F é obtido dividindo-se variância numericamente maior pela de menor valor.

$$F = S^2_1 / S^2_2$$

Onde, $S^2_1 > S^2_2$ e

S^2_1 = Variância da amostra 1;

S^2_2 = Variância da amostra 2;

n = número de pontos da amostra e

o Grau de Liberdade G.L. = n – 1

A distribuição teórica de F é descrita por uma função matemática cuja forma da distribuição é determinada pelo número de graus de liberdade utilizados no cálculo de S^2_1 e de S^2_2 , respectivamente. Os valores de F crítico são apresentados em de tabelas específicas.

Na comparação de duas variâncias são testadas duas hipóteses:

A hipótese nula (H_0), para S^{2_1} igual S^{2_2} e a hipótese H_1 , para S^{2_1} diferente de S^{2_2} : o teste é bi-caudal. Verificada a Hipótese H_1 (e a probabilidade de que sua aceitação reflita, de fato, uma diferença real) se aceita que as variâncias são diferentes e, conseqüentemente, que as duas amostras testadas correspondem a populações diferentes.

Encontrado o valor **F**, o passo seguinte é a verificação da semelhança ou não das médias de duas amostras que foi feita aplicando-se o teste do t- Student.

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 * n_2} * \frac{SQ_1 + SQ_2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

Onde;

X_1 = média da amostra 1;

X_2 = média da amostra 2;

SQ = soma dos quadrados dos desvios;

n = número de dados da amostra e Graus de Liberdade G.L. = $n_1 + n_2 - 2$

Aplicados aos resultados dos testes de homogeneidade dos grupos experimentais A, B e C, testados dois a dois. Primeiramente o teste de variância, e a aplicação do teste F para os pares de amostras BA, CA e BC, depois ao teste das médias, o teste t-student, para os mesmos pares. Após estes, foi feita uma comparação entre ambos os testes e entre as

médias de cada grupo para analisar a influência da mudança da taxa de dose entre as amostras, para um nível de confiança de 95% e com um grau de incerteza de 5% (Tauhata;1991,Carzola,1999).

CAPÍTULO V

RESULTADOS

V.1 - Aplicação do teste de pêlos estaminais com a *Tradescantia* clone 4430

Conforme mencionado no item IV.2.2, dos ensaios realizados com a *Tradescantia* clone 4430, devido a sua extrema sensibilidade a variações climáticas, e a sua difícil adaptação, somente um ensaio anteriormente realizado teve êxito, tendo sido revisado e aceito, quando submetido, recentemente, à publicação (Santos *et al*, 2005). O estudo se baseou nessa sensibilidade elevada para realizar um teste de mutagenicidade (Trad-SHM), com bioensaios “in situ”, para determinar as respostas induzidas pela exposição da *Tradescantia* clone 4430, aos níveis baixos de radiação. A mutagênese foi avaliada durante 28 dias, em um ambiente submetido às seguintes taxas de dose: grupo A – 0,84 $\mu\text{Gy/h}$ (controle); grupo B – 13,1 $\mu\text{Gy/h}$ e grupo C – 39,4 $\mu\text{Gy/h}$, sendo analisadas em três períodos de sete dias, pois a resposta ao primeiro dia de exposição, é somente coletada a partir da segunda semana. Como a região é rica em Caldasita, para se conseguir a taxa de 39,4 $\mu\text{Gy/h}$ foram depositadas no local duas bombonas de Torta II, conforme mostra a Figura V.1. O ensaio foi realizado na COLAB, Coordenação de Laboratórios da Comissão Nacional de Energia Nuclear, CNEN, localizada no município de Poços de Caldas – Minas Gerais.

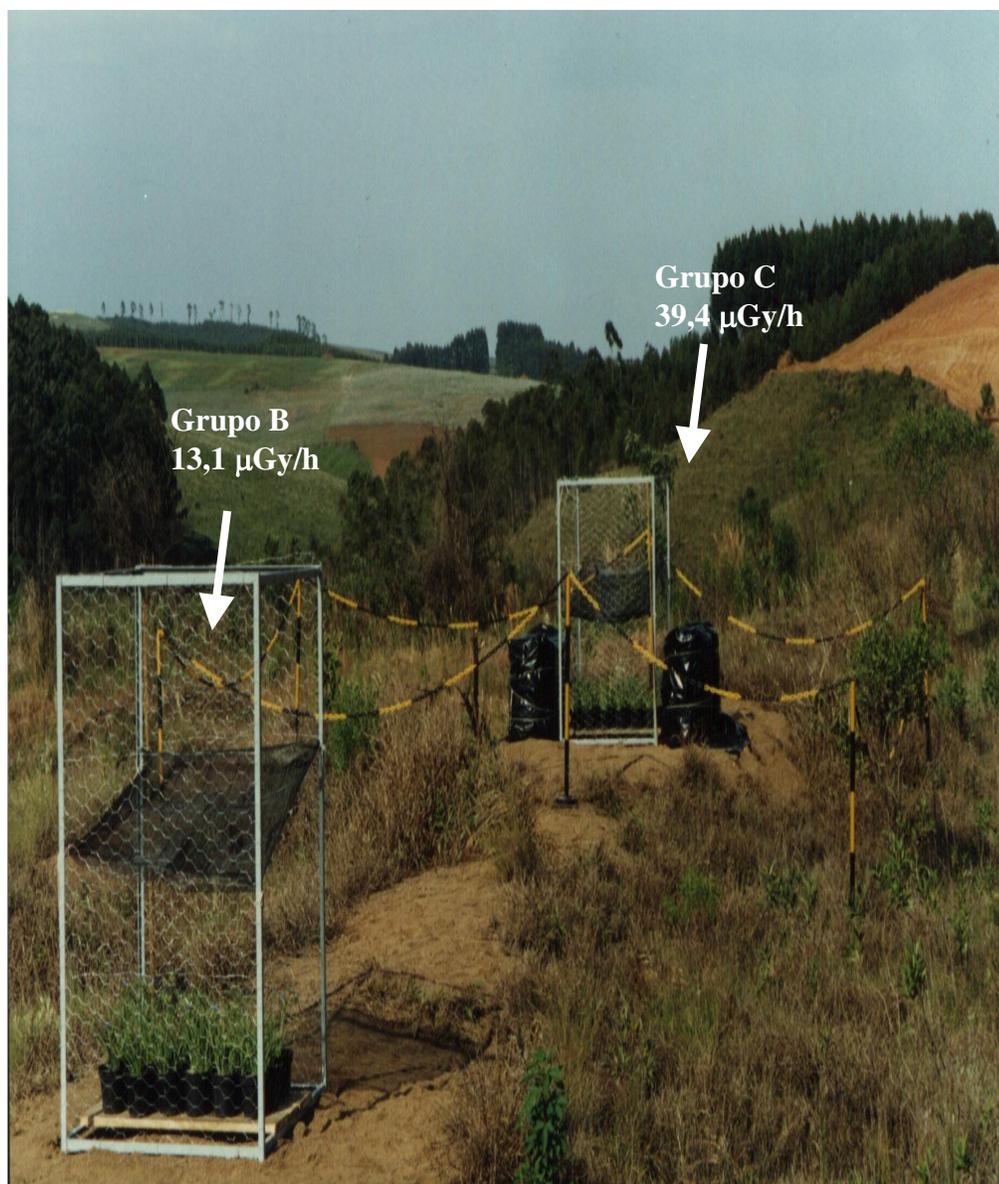


Figura V.1 Locais de exposição da *Tradescantia* clone 4430, na COLAB.

Considerando-se as peculiaridades do experimento, a discussão parte dos seguintes fatos:

1. os eventos observados no dia *d* refletem, de fato, o potencial mutagênico do ambiente no qual a planta se encontrava num período de 7 a 12 dias anteriores a esse dia *d* (Rodrigues,1991);
2. no período que antecedeu o início do experimento, os três grupos experimentais encontravam-se em um mesmo ambiente, a saber, a Casa de Vegetação da COLAB, onde os estoques da planta são mantidos e cuja taxa de exposição

corresponde a 0,84 $\mu\text{Gy/h}$;

3. a taxa de exposição à qual foi submetido o Grupo A é semelhante àquela da casa de vegetação, isto é, 0,84 $\mu\text{Gy/h}$;
4. nos primeiros dias de análise (entre 1 e 07 dias) os três grupos (A, B e C) estarão refletindo o potencial mutagênico da Casa de Vegetação ;
5. se as taxas de exposição nas quais o experimento foi conduzido influem significativamente na frequência de eventos “rosa”, esta influência deverá ser observada a partir do momento em que o sistema passar a refletir o potencial mutagênico do ponto experimental, isto é, por volta de 7 a 12 dias após o início do experimento;

Com base nestas afirmativas, nas Figuras V.2 e V.3 e para fins de interpretação dos resultados, foi feita uma divisão do experimento em três fases:

Fase I: correspondente aos primeiros 7 dias de exposição: refletiria a frequência de eventos “rosa” determinada pelo potencial mutagênico da Casa de Vegetação isto é, a frequência de eventos mutagênicos antes do início do experimento propriamente dito.

Fase II: correspondente à segunda semana de exposição e à primeira semana de resposta efetiva às condições definidas pelo experimento.

Fase III: correspondente às terceiras e quartas semanas de exposição e às segunda e terceira semanas de resposta às condições definidas pelo experimento.

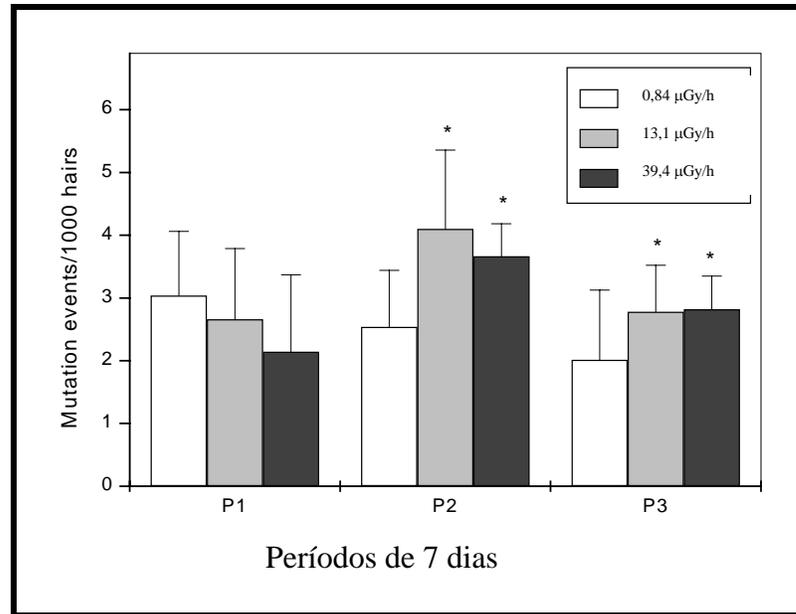


Figura V.2 – Número de eventos mutacionais “rosa” na *Tradescantia*, clone 4430, para as diferentes taxas por períodos de exposição (*: $p < 0.05$).

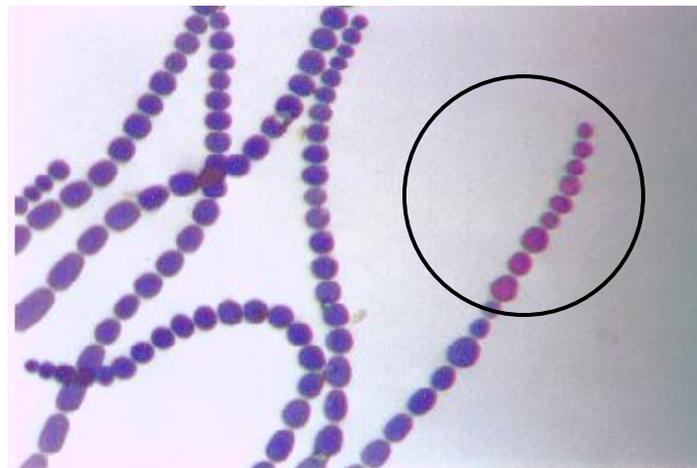


Figura V.3 – Imagem de um pêlo estaminal da *Tradescantia* clone 4430 com a mutação na cor rosa observada.

Este ensaio, através do teste de pêlo estaminal da *Tradescantia* clone 4430, apresentou resultados favoráveis e respostas confiáveis para baixas doses de radiação (devido ao grande número de dados obtidos num curto período de tempo, anexo 3). Na Fase I - os resultados são compatíveis com as expectativas. De acordo com os testes de homogeneidade, aplicados nos Grupos A, B e C, testados dois a dois, é possível afirmar-se,

com 95% de probabilidade de acerto, que não existem diferenças significativas entre os três grupos testados. Os três grupos pertencem a uma mesma população e a frequência de eventos “rosa” reflete a exposição a um potencial mutagênico único, a saber, aquele da Casa de Vegetação na qual os estoques de *Tradescantia* são mantidos. Na Fase II - os resultados obtidos na primeira semana de resposta às condições experimentais apontam para diferenças significativas entre os Grupos A e B e entre os Grupos A e C. Os mesmos resultados indicam não haver diferença significativa entre os grupos B e C. Considerando-se que todos os parâmetros experimentais, com exceção das taxas de dose, eram comuns aos três locais nos quais os vasos foram mantidos, pode-se imputar às diferentes taxas de exposição, as diferenças observadas nas frequências de eventos “rosa”, na Fase II. Cabe observar ainda que, embora as taxas de dose sejam significativamente diferentes (0,84, 13,1 e 39,4 $\mu\text{Gy/h}$), as respostas observadas não refletem tais diferenças o que permite supor que, para esses níveis de taxa de dose, a intensidade da resposta é definida pelo próprio sistema testado e pelo estresse provocado pela radioatividade a que se encontra exposto. E por ultimo na Fase III – os resultados obtidos na Fase III revelam o restabelecimento da homogeneidade entre os Grupos A e B e A e C e confirma a ausência de diferença significativa entre as frequências de eventos “rosa” nos Grupos B e C. Considerando-se que o Grupo A permaneceu exposto a 0,84 $\mu\text{Gy/h}$ durante todo o experimento assim como durante seu desenvolvimento na Casa de Vegetação (taxa de dose = 0,84 $\mu\text{Gy/h}$) o restabelecimento da homogeneidade entre os três Grupos indica que, após um período de “turbulência”, ocorre à volta ao que seria uma situação de “normalidade”.

V.2. Aplicação do teste de micronúcleos com a *Tradescantia Pallida*:

Conforme mencionado no item IV.2.3, escolheu-se como locais de exposição: o DRR/IEN, o DRR/Usina Nuclear de Angra I, o DRR/ IPEN e o DRR/ Abadia de Goiás, de acordo com suas características.

V.2.1. Medidas realizadas no depósito de rejeitos radioativos do Instituto de Engenharia Nuclear - IEN

Para o teste de micronúcleo com a *Tradescantia Pallida* foram selecionados três grupos: de controle, onde a taxa de dose era próxima a do local de cultivo (0,26 $\mu\text{Gy/h}$), o segundo e o terceiro pontos foram selecionados, após a realização de um levantamento radiométrico, no local da exposição. Para tal, foi utilizado o monitor MRA GP500, modelo 7237/03-44, tendo sido refeitas as medidas pelo técnico de radioproteção, para a verificação sobre a coerência das medidas. Dessa forma, foram estabelecidos dois grupos: grupo A, correspondente à taxa de dose de 21,9 $\mu\text{Gy/h}$, a um metro de distância do portão de acesso ao depósito; grupo B, referente à taxa de dose de 35,1 $\mu\text{Gy/h}$, junto ao portão de acesso ao depósito. O esquema da planta baixa da área do depósito de rejeitos radioativos do IEN/CNEN é mostrado na Figura V.4, onde os locais escolhidos para a exposição da *Tradescantia* (grupos A e B) são evidenciados.

ESQUEMA LOCAL

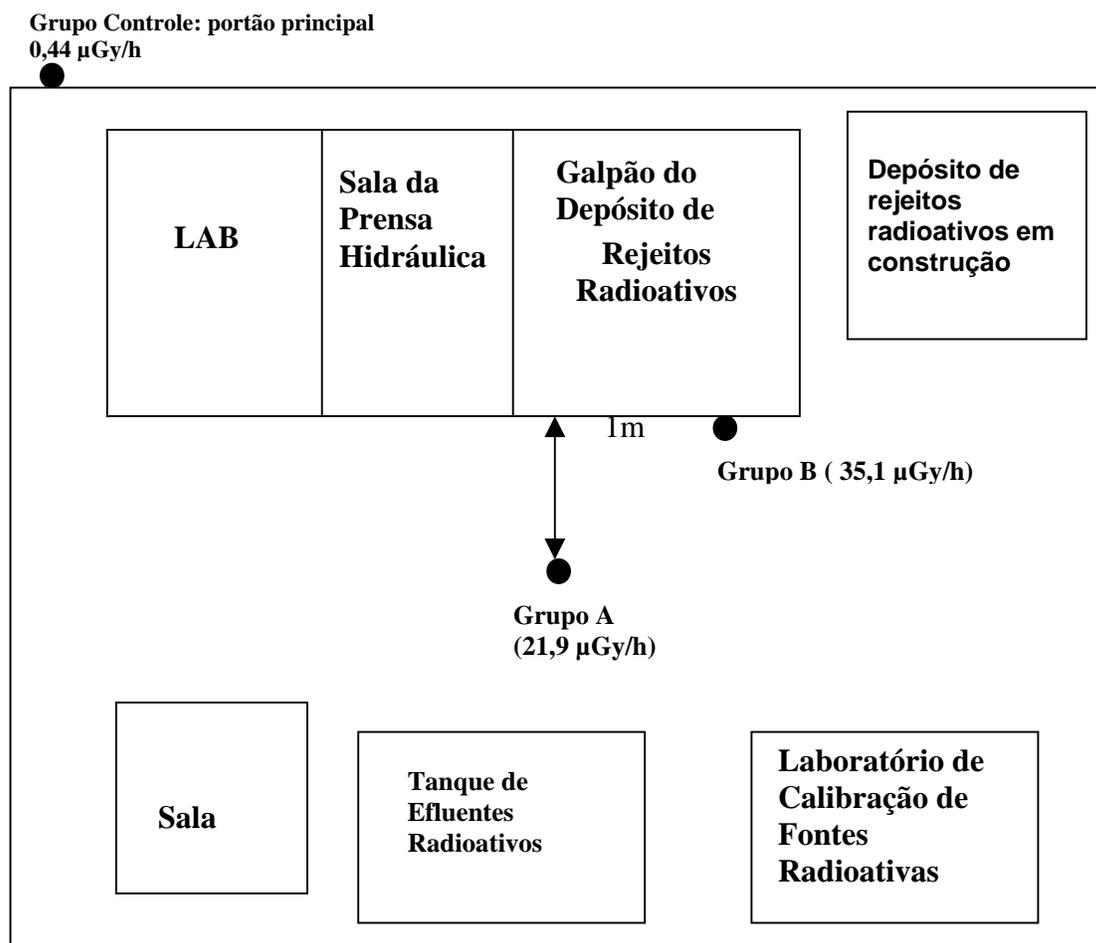


Figura V.4 Localização dos pontos de referência para exposição do biossensor junto ao DRR/IEN/CNEN.

Na relação fornecida pelo setor de Divisão de Rejeitos/IEN, os rejeitos armazenados dentro do depósito, constam aproximadamente 190 latões de 200 e 100 litros, pintados na cor amarelos, identificados e catalogados. Encontram-se dispostos sobre estrados de ferro com capacidade para quatro latões e empilhamento máximo de quatro estrados.

Os principais radionuclídeos armazenados no galpão de rejeitos são: césio 137; rádio 226; estrôncio 90; bromo 82; cobalto 62; thório 232; kriptônio 85; amerício 241; urânio 235 e outros. Do levantamento de dados realizados em 28/10/2003. constam como armazenados os seguintes rejeitos:

- Pó de Urânio e Tório;
- Chumbo contaminado;
- Madeira contaminada;
- Lixo compactável;
- Lixo não compactável;
- Fezes contaminadas (Goiânia);
- Banheira contaminada (Goiânia);
- Terra contaminada;
- Pára-raios radiativos;
- Detectores de fumaça;
- Lixo hospitalar radioativo (carbono 14)
- Tijolos contaminados (Goiânia)
- Parafina contaminada
- Três fontes de nêutrons com blindagem de parafina borada.
- Cinco fontes não empilhadas (no chão) de aproximadamente 500 kg e 1000kg.
- Aproximadamente 400 litros de solução de Amerício e Urânio armazenados em estantes de ferro.
- Aproximadamente 50 minérios radioativos.

V.2.1.1 Dados obtidos

Conforme descrito no item IV.5, a análise por microscopia ótica das inflorescências nas amostras de *Tradescantia Pallida*, após a submissão às taxas de dose 0,44 $\mu\text{Gy/h}$, 21,9 $\mu\text{Gy/h}$ e 35,1 $\mu\text{Gy/h}$, respectivamente, nos pontos do DRR/IEN, resultou na quantidade de micronúcleos representados na Figura V.5, em função das amostras por grupo (10 amostras/grupo) e das taxas de dose no local.

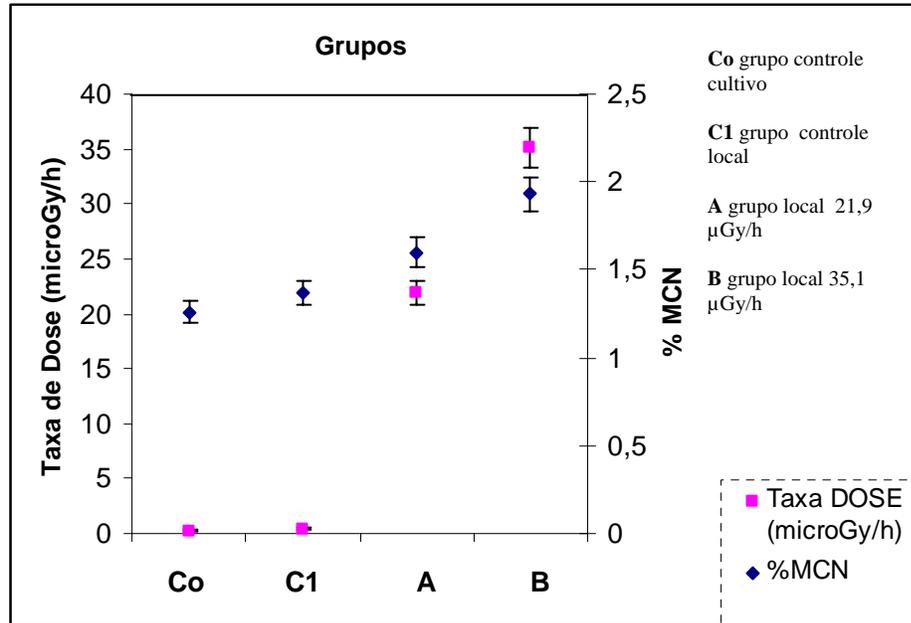


Figura V.5 - Representação gráfica da quantidade de micronúcleos encontrado nas amostras de *Tradescantia Pallida* expostas nas proximidades do DRR/IEN e correspondentes taxas de dose.

V.2.2. Medidas realizadas no depósito de rejeitos radioativos da Usina Nuclear de Angra I – UNA/Eletronuclear.

Para os ensaios realizados no depósito da Usina Nuclear de Angra, foram selecionados três grupos: o controle, onde as taxas de dose eram próximas ao do local de cultivo, 0,35 µGy/h; o segundo e o terceiro pontos foram selecionados, após ter sido feito o levantamento radiométrico no local, com o monitor MRA GP500, modelo 7237/03-44, onde o grupo A correspondeu a uma taxa de dose de 25,4 µGy/h e o grupo B, a de 46,5 µGy/h. As Figuras V.6 e V.7 ilustra o local de exposição no depósito.



Figura V.6 – Grupo A: taxa de dose de 25,4 $\mu\text{Gy/h}$, no portão de entrada do DRR/UNA.



Figura V.7. – Grupo Controle local no DRR/UNA

V.2.2.1 Dados obtidos

Selecionados os grupos, foram colocadas as amostras contendo as inflorescências da *Tradescantia Pallida*. Partiu-se para o primeiro conjunto de resultados obtidos com o objetivo de se quantificar os eventos mutacionais da *Tradescantia* em resposta às doses, nas proximidades do depósito de rejeitos radioativos de Angra. A Figura V.8 ilustra o percentual de micronúcleos encontrados, em função da taxa de dose em cada grupo.

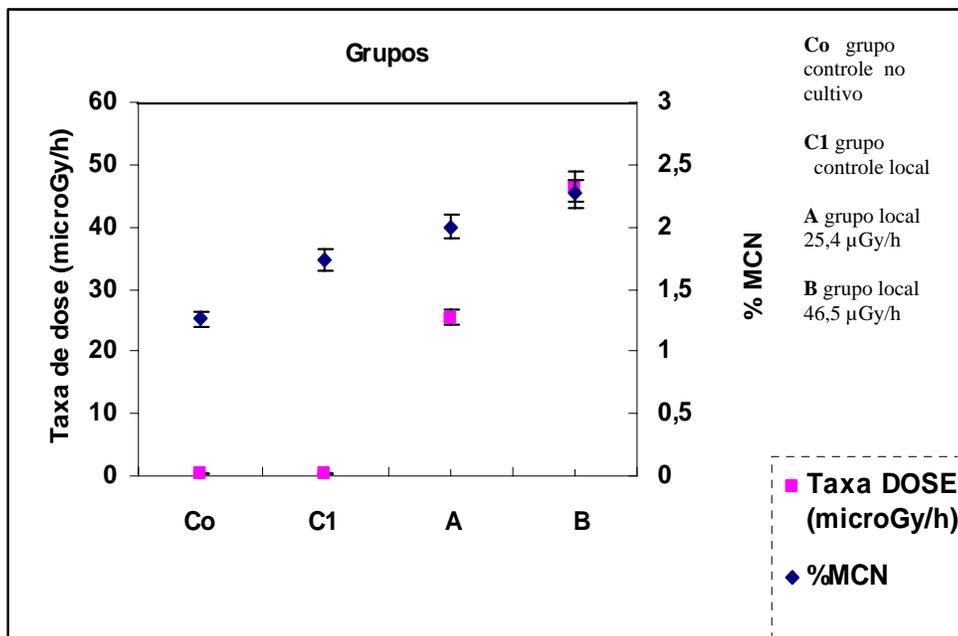


Figura V.8 – Representação gráfica da quantidade de micronúcleos encontrados nas amostras de *Tradescantia Pallida* expostas nas proximidades do DRR/UNA e correspondentes taxas de dose.

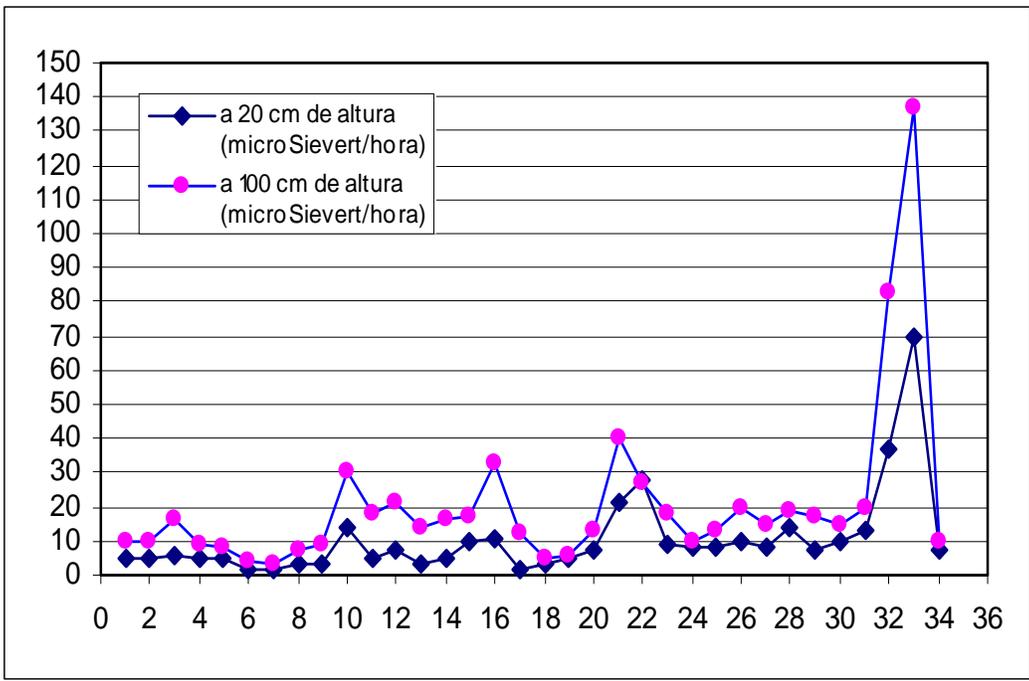
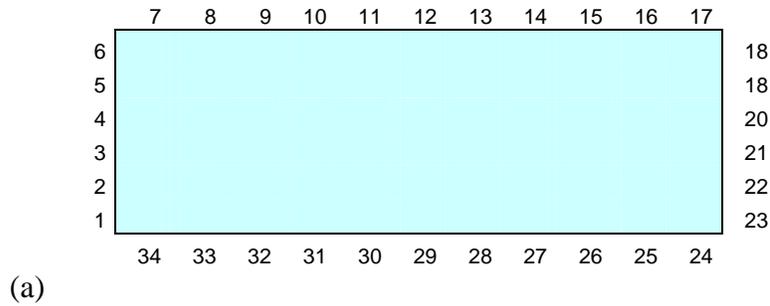
V.2.3. Medidas realizadas no depósito de rejeitos radioativos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN

No depósito do IPEN, foram realizados os ensaios para a avaliação dos efeitos mutagênicos do biosensor, onde três grupos foram selecionados, a saber: o controle, 0,44 $\mu\text{Gy/h}$; o grupo A e o grupo B, cujos pontos foram selecionados, após o levantamento radiométrico, com o monitor MRA GP500, modelo 7237/03-44. O grupo A, correspondeu a uma taxa de dose 30 $\mu\text{Gy/h}$ e o grupo B, de 137 $\mu\text{Gy/h}$. A Figura V.9 mostra o local de exposição do biosensor no DRR/IPEN.



Figura V.9 – Visão lateral do depósito de rejeitos radioativos do IPEN, mostrando o local de exposição do biosensor.

O esquema da Figura V.10(a) mostra a disposição dos pontos de medidas considerado no levantamento radiométrico feito em 28 de outubro de 2004, ao redor do laboratório de rejeitos radiativos do IPEN. O conteúdo e a disposição dos materiais dentro do depósito não foram divulgados. A Figura V.10(b) é a representação gráfica das correspondentes taxas de dose medidas nesses pontos, com o monitor MRA G, modelo 7237/03-44, nos arredores do depósito.



(b)

Figura V.10. (a) disposição dos locais selecionados para medidas radiométrica; (b) correspondente radiométrico. (Dados fornecidos pelo IPEN, 28/10/2004).

V.2.3.1 Dados obtidos

Selecionados os grupos, foram colocadas as plantas contendo as inflorescências da *Tradescantia Pallida*. Partiu-se para o primeiro conjunto de resultados obtidos, com o objetivo de se quantificar os eventos mutacionais da *Tradescantia* em resposta às doses nas

proximidades do DRR/IPEN. A Figura V.11 ilustra o percentual de micronúcleos encontrados em função da taxa de dose em cada grupo.

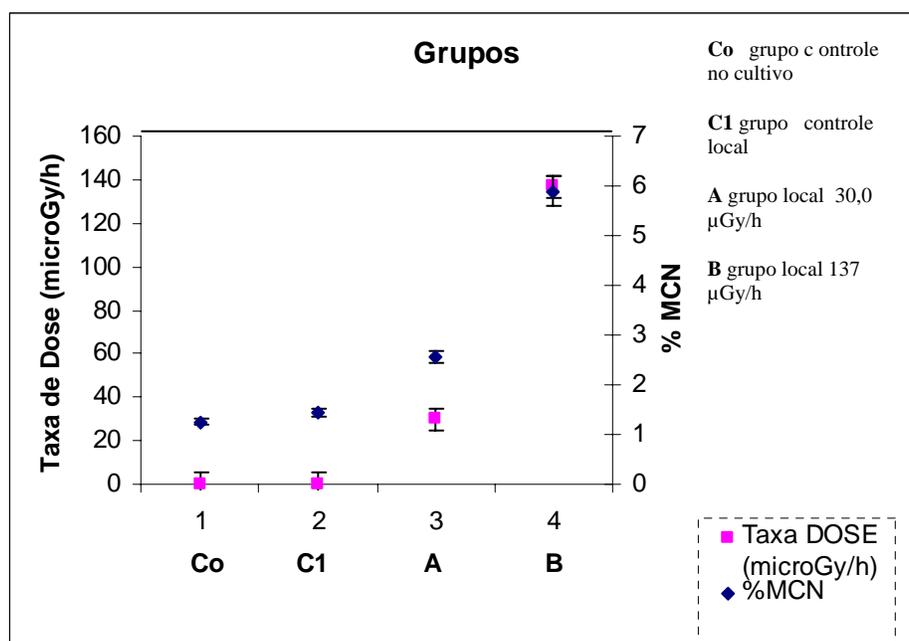


Figura V.11 – Representação gráfica da quantidade de micronúcleos encontrados nas amostras de *Tradescantia Pallida* expostas nos arredores do DRR/IPEN.

V.2.4. Medidas realizadas no depósito permanente de rejeitos radioativos de Abadia de Goiás - ABADIA

No DRR/ABADIA, foram realizados os ensaios, onde foram selecionados três grupos: o controle, $0,26 \mu\text{Gy/h}$; o grupo A e o grupo B, cujos pontos foram selecionados, após o levantamento radiométrico realizado com o monitor MRA GP500, modelo 7237/03-44. O grupo A correspondeu a uma taxa de dose $2,2 \mu\text{Gy/h}$, e o grupo B a de $3,1 \mu\text{Gy/h}$. A Figura V.12 mostra a visão geral do local de exposição no depósito.



Figura V.12 – Visão Geral do depósito de rejeitos radioativos da ABADIA.

No DRR/ABADIA, está confinados todo o material relacionado ao acidente de Goiânia de 1987, cerca de 400 toneladas rejeitos, dentre estes, restos de animais, solo, plantas e todo o material contaminado encontrado.

V.2.4.1 Dados obtidos

As flores contendo as inflorescências da *Tradescantia Pallida* foram colocadas nos pontos selecionados, grupo controle, grupo A e grupo B, a fim de se verificar as respostas da exposição a baixas doses de radiação encontradas. A Figura V.13 ilustra o percentual de micronúcleos encontrados, em função da taxa de dose em cada grupo.

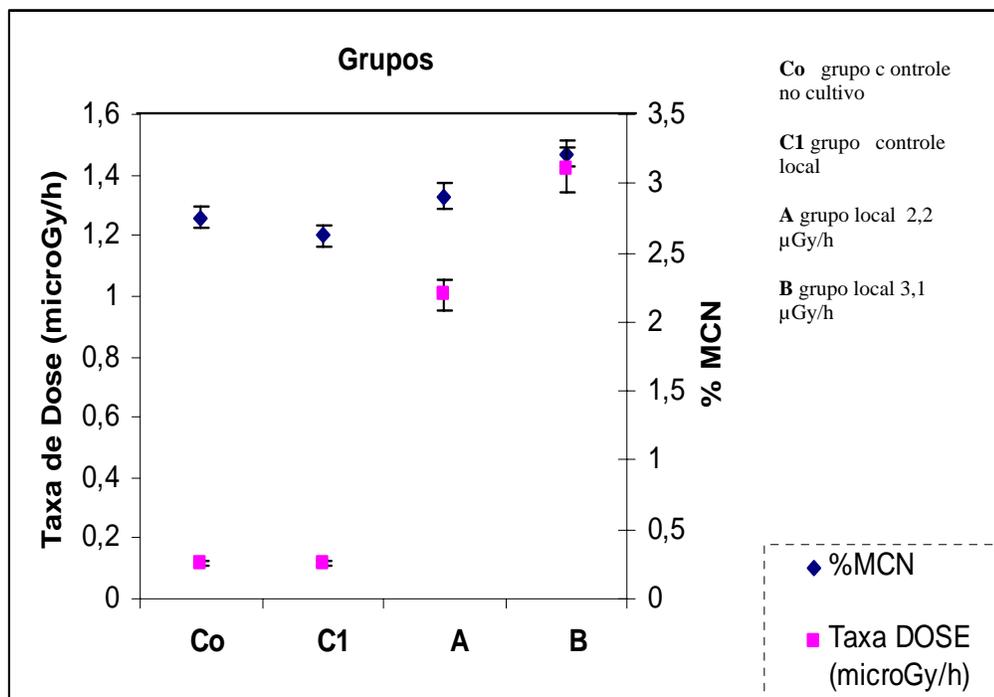


Figura V.13. Representação gráfica da quantidade de micronúcleos encontrados nas amostras de *Tradescantia Pallida* expostas nos arredores do DRR/ABADIA.

V.2.5. Comparação entre os grupos controles.

Para uma melhor compreensão das possíveis influências que poderiam ter causado algum tipo de estresse no biosensor durante o transporte, foi montado o gráfico mostrado na Figura V.14, objetivando-se avaliar as respostas referentes aos níveis de radiação nos grupos controle mantidos nos locais inspecionados: local de cultivo; DRR/IEN, DRR/UNA, DRR/IPEN e o DRR/ABADIA.

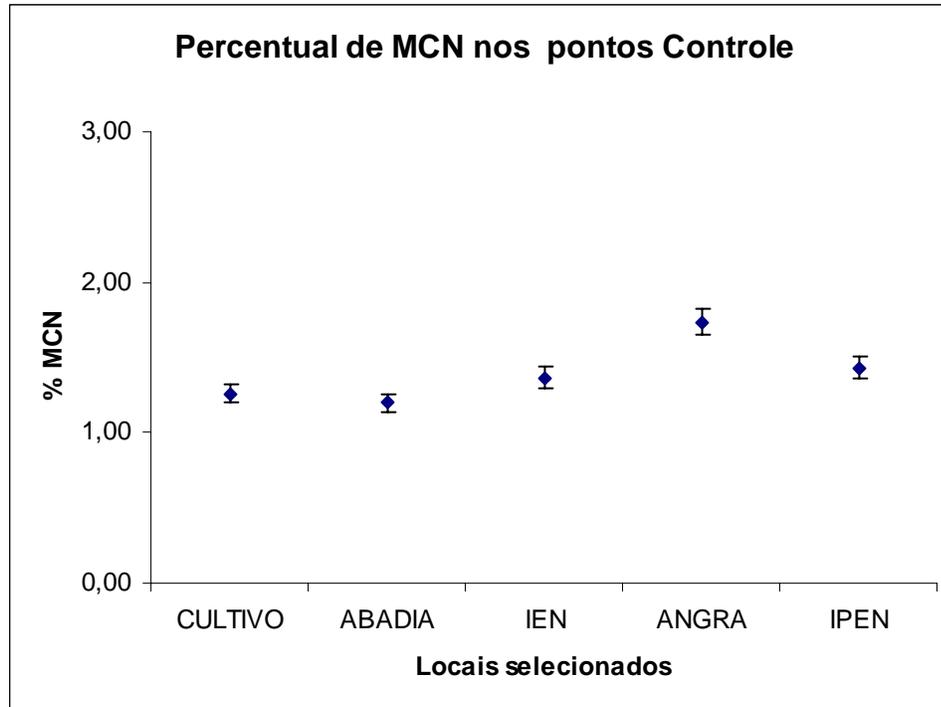


Figura V.14. Comparação entre as taxas de mutação, dados em % de MCN, nos grupos controle.

Quando as taxas de mutações foram comparadas à aplicação do teste estatístico F, quanto ao parâmetro de variância, revelou que não houve uma diferença significativa ($p > 0.05$), para uma incerteza de 5%, nas frequências de micronúcleos medidas nos pontos de controles do DRR/IEN, DRR/IPEN e da DRR/ABADIA, quando comparadas. O ponto de controle colocado nas proximidades do DRR/UNA apresentou uma diferença significativa ($p < 0.05$), quando comparada ao controle de local do cultivo. Essa diferença pode ter sido induzida por alguma alteração climática (temperatura média de 24°C), ou alguma outra alteração local durante as 24 horas de exposição.

Já que as taxas de mutações nos grupos controle dos diferentes DRR não apresentaram nível de significância quanto ao nível de estresse, procedeu-se à comparação das frequências de micronúcleos observadas, dadas em percentual de MCN, nesses mesmos locais de exposição. Relativamente a cada depósito de rejeitos radioativos, analisou-se um total de 9000 células (tétrades). Todas as contagens foram comparadas com as do grupo

controle (C1) e com as do grupo controle no local de cultivo (Co), no qual a taxa de dose medida foi de 0,26 $\mu\text{Gy/h}$.

Ao se relacionar o grupo Co com os grupo A e B, observou-se que as respostas para o grupo A, nos DRR/IEN e de DRR/ABADIA, respectivamente, não apresentaram uma diferença significativa ($p>0.05$). Para o grupo A, DRR/UNA e do DRR/IPEN (nível intermediário), notou-se um aumento na frequência mutacional, detectando-se uma diferença significativa ($p<0,05$). Para o grupo B, também se detectou uma diferença para os DRR/UNA, do DRR/IEN e do DRR/IPEN. Apenas o DRR/ABADIA não apresentou diferença significativa, quando comparado com o local de cultivo, tendo 95% de confiabilidade.

V.2.6. Curva mutagênica em função da taxa de dose.

A curva vista na Figura V.15 demonstra a relação encontrada entre as taxas de dose e a frequência de micronúcleos em 100 tétrades.

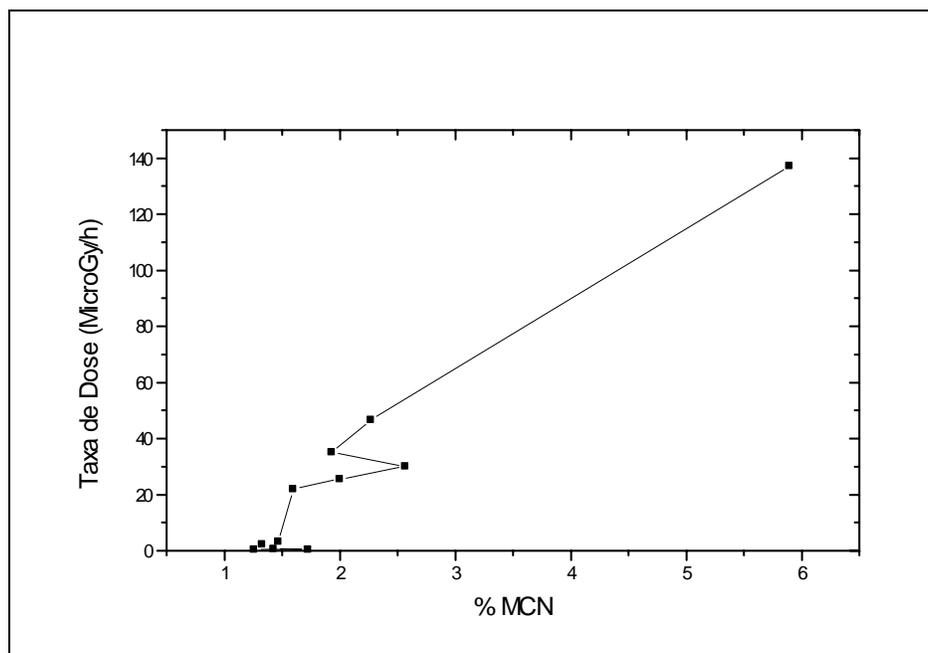


Figura V.15 – Escala mutagênica em função da taxa de dose absorvida.

V.2.7. Comparação entre a frequência de MCN por célula analisada para os grupos A e B em cada DRR.

Foi realizada uma comparação entre a frequência de micronúcleos por célula, para ensaios realizados com os grupos A e B em todos os depósitos. Não foram construídos os gráficos dos grupos Co e C1 por esses apresentarem quase toda a sua resposta mutagênica com apenas 1 MCN/célula. Os gráficos a seguir ilustram essas comparações realizadas em níveis do local e quantidade de micronúcleos por célula. As Figura V.16 e V.17 ilustram o número de micronúcleos total encontrados nas amostras dos grupos A e B, respectivamente.

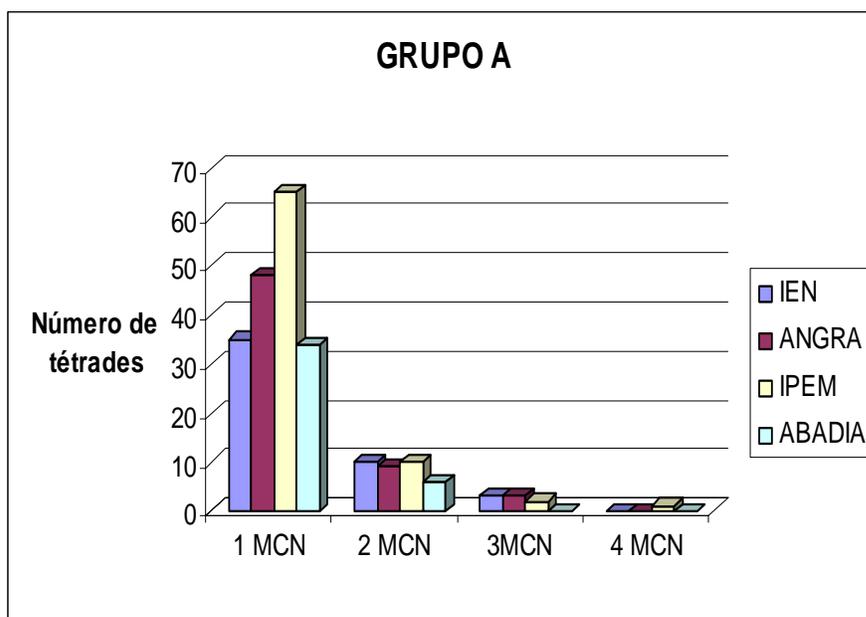


Figura V.16 – Comparação entre o número de MCN por célula do grupo A em cada DRR/local selecionado.

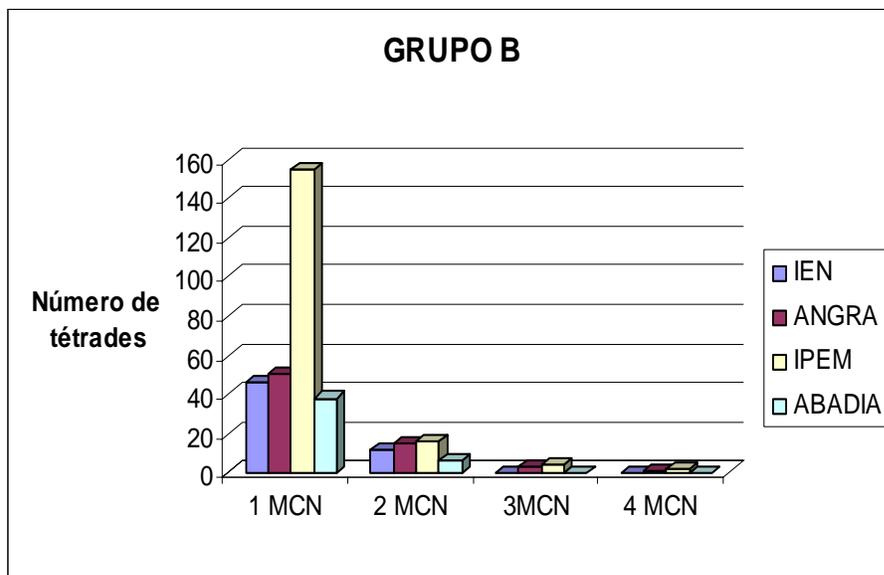


Figura V.17 – Comparação entre o número de MCN por célula do grupo B em cada DRR/local selecionado.

Através desta comparação foi observado que os grupos que tiveram as maiores taxas de dose, DRR/UNA e DRR/IPEN, cujas taxas eram: para o grupo A; 25,4 e 30 $\mu\text{Gy/h}$ e para o grupo B; 46,5 e 137 $\mu\text{Gy/h}$, respectivamente, apresentaram um dano maior nas células na fase de tétrades, resultando no aumento de MCN por tétrades. Nestes DRR, foram encontrados células com 3 e 4 MCN por célula. Estes resultados informam que com o aumento da taxa de dose o dano por célula pode ser maior.

V.2.8. Exposição Crônica

Duas exposições crônicas foram realizadas para se verificar as respostas do biosensor em um maior intervalo de tempo. Primeiramente, o biosensor foi exposto no DRR/IEN, por 8 dias, e depois, por 30 dias. Dois grupos foram selecionados em pontos estratégicos, cujas taxas de dose eram próximas aos do controle anterior, (0,45 $\mu\text{Gy/h}$), e um ponto cuja taxa de dose era de 40 $\mu\text{Gy/h}$. Foram analisadas 20 amostras de cada ponto, para os dois períodos de exposição, totalizando 24.000 células analisadas. A Figura V.18 apresenta as curvas de taxa de dose absorvida e de percentual de micronúcleo em relação a

cada grupo analisado. Foi adicionado ao gráfico o dado anterior da exposição aguda, no grupo C1 e o grupo B (35,1 μ Gy/h), cuja taxa se aproxima da taxa escolhida para o ponto A (40 μ Gy/h) na exposição crônica.

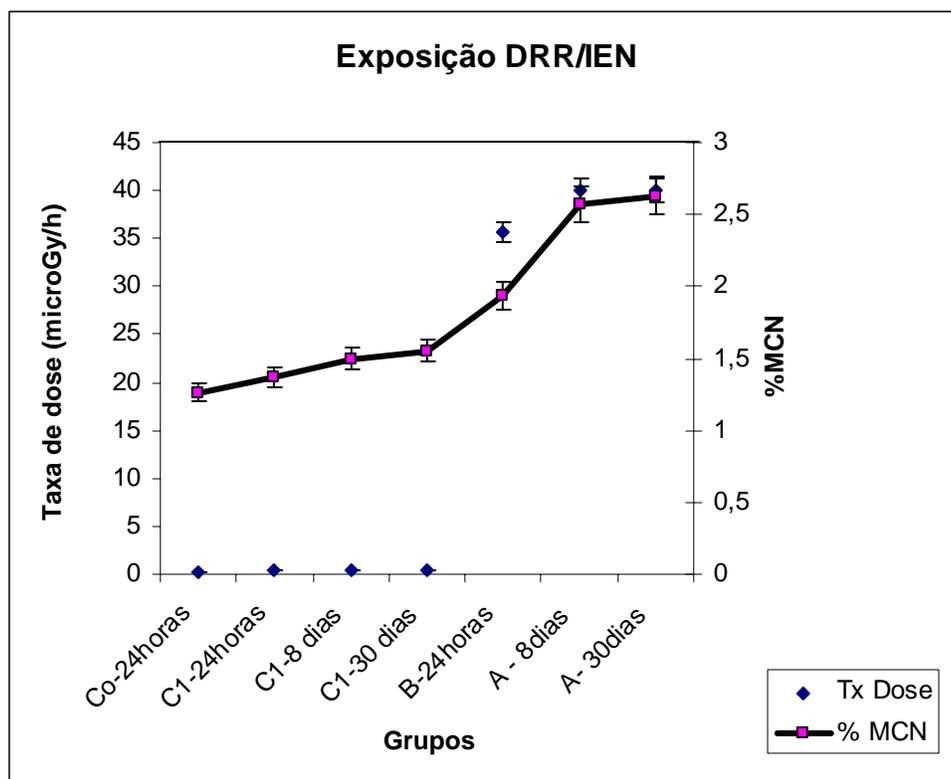


Figura V.18 comparação das respostas do biosensor, em % MCN, relacionando as taxas de dose absorvida e aos grupos referentes, em função do tempo em que foi exposto.

O gráfico acima apresenta comparação das respostas do biosensor às exposições, no DRR/IEN. Em destaque, a curva do percentual de micronúcleo encontrado para os períodos de 24 horas, 8 dias e 30 dias. Para os grupos controles, verifica-se que não há uma diferença significativa entre o grupo de controle do cultivo, o grupo controle local-24 horas e o grupo controle-8 e 30 dias, tendo estes variado entre 1,4 a 1,6 no percentual de micronúcleos ($p>0.05$). Quando observado o grupo B (35,1 μ Gy/h), 24horas de exposição e o grupo A (40 μ Gy/h) para o período de 8 e 30 dias de exposição, verifica-se que um aumento no percentual de micronúcleos da exposição crônica em relação à exposição

aguda. Quando comparamos os resultados obtidos do percentual de MCN, para os períodos de 8 e 30 dias, não obtivemos um percentual de MCN muito grande, estando este quase estabilizado.

Para o grupo A ($40\mu\text{Gy/h}$) para os períodos de 8 e 30 dias, parece que o biosensor sofre um estresse quando submetido por um maior período de tempo, respondendo a essa situação que se reflete em mutações em suas células através do acréscimo do percentual de micronúcleos, quando comparados com a exposição aguda, grupo B ($35,1\mu\text{Gy/h}$). Depois de um certo tempo, com a mesma taxa de dose (período de 8 e 30 dias), parece que o sistema tenta se adaptar àquelas condições, tentando se restabelecer, o que reflete na diminuição ou estabilização do percentual de micronúcleos.

Quando os biosensores voltam ao local de origem (local de cultivo), alcançam o número percentual inicial de micronúcleos. Caso seja submetido a uma nova exposição a taxas maiores, observa-se novamente um acréscimo na frequência mutacional do biosensor.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Esta tese teve como objetivo principal estudar os efeitos mutagênicos em biosensores devido a sua exposição a taxas de dose, nas proximidades de depósitos de rejeitos radioativos, utilizando a metodologia Trad-MCN e a Trad-SHM, através do trabalho desenvolvido, chegou-se às seguintes conclusões:

- 1) Com intuito de se verificar os testes existentes e qualificar o melhor biosensor, foi descartada a possibilidade de utilizar a *Tradescantia* clone 4430, devido aos problemas apresentados na adaptação da planta às regiões de clima quente. Esta apresentou problemas como morte, ou não floração o que impossibilitou a sua análise. A *Tradescantia* clone 4430, melhor se adapta a regiões de clima frio e com condições controladas, cultivadas em casa de vegetação.
- 2) Como o interesse era de se indicar possíveis bioindicadores e metodologias que possam ser realizadas no local, de maneira mais rápida, esse fato limitou o uso da *Tradescantia* clone 4430. Por outro lado, em Poços de Caldas (COLAB/CNEN), é importante ressaltar que o teste Trad_SHM tem apresentado bons resultados (Santos *et al*, 2005; Gomes *et al*, 2002), apesar de requerer cuidados especiais no seu cultivo. Do ensaio aqui apresentado, utilizando a *Tradescantia* clone 4430 (Trad_SHM) conclui-se que: não existiu linearidade entre taxa de eventos mutacionais e as taxas de doses envolvidas no experimento; o padrão de resposta varia em função do momento em que é feita a observação: estudos que se restringissem à segunda semana de experimentação levariam à conclusão de que taxas de exposição da ordem de 13,1 e 39,4 $\mu\text{Gy/h}$ resultam em aumentos

significativos nas taxas de mutação, a continuidade das observações revela que, após um período de instabilidade e, pelo menos pelas duas semanas que se seguem, a planta retorna ao que seria a incidência natural de eventos mutacionais, determinado para casa de vegetação da COLAB;

- 3) Visando avaliar o comportamento de um biosensor, foi testado a *Tradescantia Pallida*, baseado na metodologia Trad-MCN, cuja planta é de fácil plantio, fácil floração e se adapta as várias regiões do País, sendo ainda uma planta ornamental que contribui para a questão paisagista de uma construção. A metodologia aplicada a este biosensor permitiu que fossem incorporadas informações sobre a relação entre os efeitos mutacionais e a taxa de dose de radiação ionizante.
- 4) Nos resultados, verificou-se que a utilização da *Tradescantia pallida* como biosensor permitiu obter um número grande de dados, em relação a sua exposição às taxas de doses de radiação. O que comprovou sua potencialidade como indicador biológico, principalmente, devido a sua morfologia e as suas características peculiares.
- 5) O teste de micronúcleo, Trad-MCN, aplicado com a *Tradescantia Pallida*, possibilitou um volume suficiente de dados para a abordagem proposta neste estudo. Destes resultados temos que:
 - ✓ As frequências de micronúcleos observadas nas células grãos de pólen, provenientes dos locais de exposição (DRR/IEN, DRR/UNA, DRR/IPEN e do DRR/ABADIA), do grupo controle (considerado ponto negativo, onde a taxa de dose era próxima à do local de cultivo), não se mostraram muito expressivas, permanecendo com uma taxa de frequência mutacional próxima à do local de cultivo ($p > 0.05$). . O ponto de controle colocado nas proximidades do DRR/UNA apresentou uma

diferença significativa ($p < 0.05$), quando comparada ao controle de local do cultivo. Essa diferença pode ter sido induzida por alguma alteração climática (temperatura média de 24°C), ou alguma outra alteração local durante as 24 horas de exposição.

- ✓ Comparando os resultados do grupo controle do local de cultivo, Co, com os grupo A e B, observa-se que as respostas para o grupo A, nos DRR/IEN e de DRR/ABADIA, respectivamente, não apresentaram uma diferença significativa ($p > 0.05$). para o grupo A, DRR/UNA e do DRR/IPEN, nota-se um aumento na frequência mutacional, detectando-se uma diferença significativa ($p < 0,05$). para o grupo B, também se detectou uma diferença para OS DRR/UNA, do DRR/IEN e do DRR/IPEN. apenas o DRR/ABADIA não apresentou diferença significativa, quando comparado com o local de cultivo, por apresentar as mais baixas taxas de dose e em consequência os menores percentuais de MCN.
- ✓ Pela comparação da quantidade de MCN por tétrades, foi observado que os grupos que tiveram as maiores taxas de dose, DRR/UNA e DRR/IPEN, apresentaram um dano maior nas células na fase de tétrades, resultando no aumento de MCN por tétrades. Nestes DRR, foram encontrados células com 3 e 4 MCN por célula. Estes resultados informam que o aumento da taxa de dose pode inserir um maior dano por célula.
- ✓ Da exposição crônica, verificou que para os grupos controles que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle local e o grupo controle do local de cultivo tendo estes variado entre 1,4 a 1,6 no percentual de micronúcleos ($p > 0.05$). Já na comparação do grupo B ($35,1\mu\text{Gy/h}$), 24 horas de exposição e o grupo A ($40\mu\text{Gy/h}$) para o período de 8 e 30 dias de exposição, verifica-se a existência de um aumento no percentual de micronúcleos na exposição crônica em relação à exposição aguda. Para o grupo A ($40\mu\text{Gy/h}$), nos períodos de 8 e 30 dias, com a mesma taxa de dose, parece que o sistema tenta se adaptar

àquelas condições, tentando se restabelecer, o que reflete na diminuição ou estabilização do percentual de micronúcleos.

- 6) Quanto à situação encontrada nos DRR, em relação às taxas de doses encontradas e os efeitos destas em um ser vivo, concluímos que: no DRR/IEN, as taxas de dose encontradas não resultaram em um grande aumento no percentual de MCN em relação ao local de cultivo; o DRR/ABADIA, bastante visado por ser o único depósito final do Brasil, foi o que apresentou as menores taxas de dose e o que menos danificou as células do biosensor, permanecendo com o percentual de micronúcleos igual ao do local de cultivo; o DRR/UNA apresentou um percentual maior na quantidade de MCN por tétrades em comparação ao DRR/IEN e ao DRR/ABADIA; e o DRR/IPEN, foi o depósito que teve as taxas de dose mais altas nas suas redondezas, o que ocasiona no maior efeito mutacional, sendo traduzido em um grande percentual de micronúcleos por células e também sendo o que mais danificou a célula apresentando tétrades com 3 e 4 MCN em maior quantidade.

Assim, as respostas da *Tradescantia* podem traduzir, então, o indicativo de risco genético e somático para a população humana quando exposta aos baixos níveis de dose. De acordo com Sparrow (1976), há grandes variações entre as frequências de mutação somática espontânea de plantas e animais, porém, devido a uma proximidade da faixa de dose da radiosensibilidade entre plantas ditas superiores e os mamíferos (Figura III.5), esses resultados podem ser inferidos, de modo a se prever os efeitos para a saúde humana. E de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, esses fatos sugerem que a constatação das ocorrências de mutagêneses na resposta da *Tradescantia* pode ser útil na prevenção de risco para os seres humanos e em consequência, pode-se utilizar este bioindicador como um alerta ao ecossistema e às populações humanas.

Os bioensaios com a *Tradescantia* podem estabelecer importantes informações sobre os efeitos genéticos das radiações ionizantes e sobre a mutagênese ambiental, tanto

para os trabalhadores, como para o público em geral, já que a escolha dos locais de construção de depósitos rejeitos radioativos permanentes é tão polêmica, sendo mais um instrumento de auxílio, indicado para monitoração ambiental, na precaução de possíveis acidentes sobre o meio ambiente. O teste de micronúcleos nas células da *Tradescantia* é vantajoso em termos de sua facilidade de análise (apesar de requerer treinamento), e do baixo grau de incerteza (Suyama *et al*; 2002). E como a susceptibilidade ao dano mutacional é maior que a do organismo humano (Sparrow,1976), o método de Trad-MCN, aplicado como um indicador da contaminação, inclusive, e associado ao uso de técnicas de biomonitoramento, torna-se um aliado essencial na relação Homem x Tecnologia.

Sugestões para Trabalhos Futuros

As sugestões de trabalhos futuros relacionam-se ao refinamento e à extensão da metodologia e, também à busca de novos mecanismos de rastreamento de biosensores que possam servir de alerta para a saúde humana ou para o meio ambiente, a saber:

- 1) Estabelecer-se um protocolo para o mapeamento das frequências mutacionais em uma instalação nuclear (DRR) para que possa ser coletada periodicamente a resposta de um biosensor (*Tradescantia pallida*), durante um ano, e se verificar as alterações, sempre que houver mudança das taxas de dose.
- 2) Fazer-se um levantamento sobre possíveis biosensores dentre as plantas da vegetação local e se verificar a possibilidade de aplicação das metodologias citadas.
- 3) Nos DRR, selecionados para esta pesquisa, notou-se a existência da planta “Dormideira” (Sensitiva) em quase todos. Realizou-se uma pré-avaliação para se verificar a possibilidade de aplicação dos testes mencionados. Infelizmente, o teste Trad_SHM não foi possível, devido à inexistência de pêlos estaminais; o teste Trad_MCN também não foi aplicado, por falta de

visualização de tétrades. Sugere-se ainda a tentativa do teste Comet Assay, para se averiguar a sensibilidade da *Sensitiva* à radiação ionizante.

- 4) Finalmente, sugere-se a realização de estudos sobre a evolução desses biosensores em INB/URA - Unidade de Concentrado de Urânio em Caetité – BA, nos moldes e cenários utilizada nesta tese, de forma a contribuir para a questão de efeito biológico versus baixa dose de radiação ionizante e da segurança das instalações nucleares, ainda que se sigam as normas de proteção radiológica e os procedimentos recomendados de segurança nacional.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- BREWEN, J.G. LUIPPOLD, H.E.,1971, “Radiation-induced human chromosome aberrations: in vitro dose rate studies”. *Mutation Research*, v.12, pp. 305–314.
- BOND V.P., 1981, Invited paper Deliverad at the 25th Annual Meeting of Health Physics Society, “Radiobiological Input to Radiation Protection Standards”, *Health Physics*, vol.41, No.6, 799-806.
- BUCHMANN, J. A, 2000, “O uso da monitoração ambiental como técnica de identificação de atividades de enriquecimento isotópico”, *Tese de doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo*,142pp.
- CALABRESE, E.J.; BELLE, 1994, “Biological effects of level exposures: dose-response relationships” - LEWIS PUBLISHERS.
- CARZOLA, I. M.;SILVA, C.B.1999, “Apostila Educação Estatística”, Curso de estatística. <http://www.socio-estatistica.com.br/edestatistica/edestatistica.htm>
- CEBUSLSKA, W.A.,SCHNEIDER, K., KIM, J.K.,2001, “Relative biological efficiency for induction of various gene mutations in normal and enriched with ¹⁰B *Tradescantia* cells by neutrons from ²⁵²Cf source”. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*,v.474, pp 57-70.
- CEBUSLKA W.A.,1992,” *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl nuclear accident and one year later”. *Mutation Research*, v.270:, pp 23-29.
- CEBUSLKA W.A.; SIJSMA, M.; CHADWICH, K.H.; LEENHOUTS, H.P., 1994,”The influence of time between cutting and irradiation on the sensitivity of *Tradescantia* stamen hair to mutation induction”, *Int. J. Radiat.Biol*, v.41, n^o 5, pp.569-574.

CNEN- NN-3.01, 2005, “Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica”. In: <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas.asp>

CNEN- NE-6.05, 2002, “Gerência de Rejeitos Radioativos em Instalações Radiativas”. In: <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas.asp>

CNEN- NE-6.06, 2002, “Seleção e Escolha de Locais para Depósitos de Rejeitos Radioativos” .”. In: <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas.asp>

CNEN- NN-6.09, 2002, “Critérios de Aceitação para Deposição de Rejeitos Radioativos de Baixo e Médio Níveis de Radiação”. In: <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas.asp>

CONSTANTIN,M.J., 1982, “Plant genetic systems with potential for the detection of atmospheric mutagens”. In: *Tice, R.R.;Costa, D.L.;Schaich,K.M.,(Ed). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York: Plenum Press, pp. 159-177.*

DELONE, N.L.; ANTIPOV,V.V.; PARFENOV,G.P., 1981, “New type of chromosomal mutation observed in *Tradescantia papulosa* microspores during experiments in space satellites”. *Dolady Akaademii Nauk Sssr*, v.290, n^o.4, pp.160-173.

ENNEVER,F. K.;ANDREANO,G.; ROSENKRANZ,H.S., 1988, “The Ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity”. *Mutation Research*, v. 205, pp. 99-105.

FRITSCH, O., KOVALCHUK, I., KOVALCHUK, O., HOHN, B., 2000, “Des bio-indicateurs de pollution radioactive”. *Environnement. Biofutur*, v.205, pp. 48-50.

GOMES, H. A.; NOUAILHETAS Y.; ALMEIDA C. E. B.; MEZRAHI A., 2002, “Biological response of *Tradescantia* Stamen-hair to High Levells of Natural Radiation in the Poços de Caldas Platea”. *Brazilian Arquives of Biology and Technology*. v. 45, n^o 3, pp. 301-307.

GOMES, H.A.; MACACINI, J.F.; NOUAILHETAS, Y.; SILVA, N.C.; RODRIGUES, G.S.; SANTOS, T.C. , 2003, “Biological response of *Tradescantia* stamen-hairs to high levels of natural radiation in the Poços de Caldas Plateau and in Brazilian radioactive

- waste deposits”. *International Conference on the Protection of the Environment from the Effects of Ionizing Radiation. IAEA-CN-109, 6-10 October, Stockholm, Sweden*, pp. 63-66.
- GOPALAN, H.N.B., 1998, “Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays”. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 426, pp. 99-102.
- GRANT, W. F., 1994, “The present of high plant bioassays for detection of environmental mutagens”. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 310, pp. 175-185.
- GRANT, W. F., 1999, “Higher plant assays for the detection of chromosomal aberration and gene mutation_ A brief historical background on their use for monitoring environmental chemicals”. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 426, pp. 113-117.
- HALL, E.J., BEDFORD , J.S., 1964, “A comparison of the effects of acute and protracted gamma-radiation on the growth of seedlings of *Vicia faba* Part I. Experimental observations”. *International Journal of Radiation Biology* , v. 8, pp. 467-474.
- HENDEE, W.R.; EDWARDS,F.M.; 1996, “Health Effects of Exposure to Low-Level Ionizing Radiation”, IOP Publishing Ltda.
- IAEA, 1978 *Late Biological Effects Of Ionizing Radiation*, Vol.I, International Atomic Agency , Vienna.
- IAEA - International Atomic Energy Agency, 1992, “Effects of Ionizing Radiation on Plants and Animals at Levels Implied by Current Radiation Protection Standards”. *Technical Report Series No. 332, International Atomic Energy Agency, Vienna..*
- ICHIKAWA, S., 1981, “ In situ monitoring with *Tradescantia* around nuclear power

- plants”. *Environ. Health Perspect.* V. 37, pp. 145–164.
- ICHIKAWA, S., 1991, “Validity of simplified scoring methods of somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs”. *Environ. Exp. Bot.* , v. 31, pp. 247–252.
- ICHIWAKA, S., 1992, “*Tradescantia* stamen-hair as an excellent botanical tester of mutagenicity; its response to ionizing radiations and chemical mutagens, and some synergistic effects found”. *Mutation Research*, v. 270, pp. 3-22.
- ICRP 60 - International Commission on Radiological Protection, 1991, “Recommendations of the International Commission on Radiological Protection”. *Publication 60*, Pergamon Press, Oxford and New York.
- ICRP 77A, 1977, International Commission on Radiobiological Protection, ICRP Publication 26, *Annals of ICRP* 1. No.3 (Oxford: Pergamon Press).
- ICRP 77B, 1977, International Commission on Radiobiological Protection, ICRP Publication 27, *Annals of ICRP* 1. No.4 (Oxford: Pergamon Press).
- JAWOROWSKI, Z., 1997, “*Beneficial Effects of Radiation and Regulatory Policy*” – Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine Volume 20 Number 3.
- JAWOROWSKI, Z., 1995, “Beneficial Radiation” – *Nukleonika* 40 n^o1, pp.3-12,
- KLUMPP, A; ANSEL, W; KLUMPP, G; FOMIN, A., 2001, “Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede europeia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet)” . *Revista Brasileira de Botânica, São Paulo*, v. 24, n^o 4 (suplemento), pp. 511-518.
- KONDO, S., 1993, *Health Effects of Low-level Radiation*, Kinki U. P., Osaka, Japan, pp 21-22.

- MA, T.H.; SPARROW,AH.; SCHAIRER,L.A.;NAUMAN,A.F., 1978, “Effect of 1,2 dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*”. *Mutation Research*, v. 58, pp. 251-258.
- MA, T.H.,1979, “Miclonuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia* – a promising mutagen system”. *Mutation Research*, v. 64, pp. 307-313.
- MA, T.H., 1981, “*Tradescantia* miclonucleus bioassay and pollen tube aberration test for in situ monitoring and mutagen screening”. *Environmental Health Perspectives*, v. 37, pp.145-164.
- MA, T.H., 1982, “*Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis. Pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis”. *A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Research*, v. 99, pp. 293-302.
- MA, T.H.; ANDERSON, V.A.; AHMED, I., 1982, “Environmental clastogens detected by meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*”. In: *TICE, R.R.; COSTA, D.L.; SCHAICH, K.M., ed. Genotoxic effects of airborne agents. New York: Plenum Press, Environmental Science Research*, v. 25, pp. 141-157.
- MA, T.H., 1983, “*Tradescantia* micronuclei (Trad-MCN) test for environmental clastogens”. In: *Kolber, A.R.; Wong,T.K.; Grant,L.D.; Dewoskin,R.S.;Hughes,T.J.’(Ed) On vitro Toxicity Testing of Environmental Agents. Current and Future Possibilities. Part A: Survey of test Systems. New York: Plenum Press*, pp. 191-214.
- MA, T.H.; CABRERA, G.L.;CELEBUSKA-WASILEWSKA, A.; CHEN R.; LOARCA F.; VANDENBERG, A.L.; SALAMONE M.F., 1994, “*Tradescantia* stamen hairmutation Bioassay”, *Mutation Research.*, v. 310, pp. 211-220.
- MA, T. H., 1998, “The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study the rands-on workshop in China”. *Mutation Research*, , *Fundamental*

and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v.426, pp. 103-106.

MA, T.H., XU, Z., 1998, "Clastogenicity of formaldehyde fumes and X-rays evaluated by the *Tradescantia*-micronucleus assay". *Mutation Research, Environmental and Experimental Botany*, v. 39, pp. 169-175.

MA, T.H.; HARRIS, M. M., ANDERSON, V. A., AHMED, I., MOHAMMAD, K., BARE, J. L., LIN, G., 1984, "Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents". *Mutation Research*, v. 138, pp. 157-167.

MA, T.H.; XU, C.; LIAO, S;.. MCCONNELL, H; JEONG B.S.; WON, C.D., 1996, "In situ monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator". *Mutation Research*, v. 359, pp. 39-52.

MA, T. H.; GRANT, W.F. , 1982, "The Tradescantia – adventurous plants". *The Herbarist*, V. 48, pp. 36-44.

NAUMAN, C. H., UNDERBRINK, A.G., SPARROW, A.H., 1975, " Influence of radiation dose rate on somatic mutation induction in *Tradescantia*". *Mutation Research*, v.59, pp. 153-154.

NAUMAN, C.H.; SCHAIRER, L.A.; SPARROW, A.H., 1976, "Comparative effects of ionizing radiation and two gaseous chemical mutagens on somatic mutation induction in on mutable and two non-mutable clones of *Tradescantia*". *Mutation Research*, v. 38, pp. 53-70.

NAUMAN, C.H.; SCHAIRER, L.A.; SPARROW, A.H., 1977b, "Influence of temperature on spontaneous and radiation-induced somatic mutation in *Tradescantia* stamen hairs". *Mutation Research*, v. 50, pp. 207-218.

NAUMAN, C.H.; SCHAIRER, L.A.; SPARROW, A.H., 1977c, "Low dose mutation

- response relationships in *Tradescantia*: Principle and comparison to mutagenesis following low dose gaseous chemical mutagen exposures”. In: *Radiobiological protection, first european symposium on rad-equivalence: proceedings. Luxemburg: commission of the european community*, v. EUR 5725e, pp.13-154.
- NAUMAN,C.H.; SCHAIRER,L.A.; AUTKULIS,R.C.;KLUG,E.E., 1977a, “Influence of hyperthermia on the spontaneous, radiation and chemical-induced mutation frequency in *Tradescantia* stamen hairs”. *Radiation Botany*, v.70, pp. 632-633.
- NAS 70 1970, U.S. National Academy of Science, “The effects on population of exposure to Low Levels of Ionizing Radiation”, BEIR-I Report (Washington, DC: NAS).
- OKONO, E., 1988, “Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios”, Editora Harbra, São Paulo, pp. 213-244.
- RODRIGUES G. S., 1999, “Bioensaios de toxicidade genética com a *Tradescantia*”, *Jaguariúna, São Paulo:Embrapa Meio Ambiente,56pp*.
- RODRIGUES, G. S., 1999a, “Bioensaios de Toxicidade Genética com Plantas Superiores: *Tradescantia* (MCN, SHM), Milho e Soja.”, *Embrapa Meio Ambiente. Circular Técnica,2. Jaguariúna. 30pp*.
- RODRIGUES, G. S., 1999b, “Bioensaios de Toxicidade Genética com *Tradescantia*”. *Embrapa Meio Ambiente. Circular Técnica,2. Jaguariúna. 56pp*.
- RUSSEL W. L., 1956, “Lack of linearity Between Mutation Rate and Dose for X-ray Induced Mutation in Mice”, *Genetics* 41, pp. 658-660.
- SANT’ANNA, E.T.G.,2003, “Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero *Tradescantia*”. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da USP.

- SANTOS, T. C., 2001, “ Resposta de *Tradescantia* a uma simulação de aumento da radioatividade natural” , *Tese de Mestrado – Departamento de Engenharia nuclear, UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro*, 63pp.
- SANTOS, T. C., 2005, “ The study of the effects of low dose level exposure to ionizing radiation using a bioindicator system” . *Applied Radiation and Isotopes, Issue 2, V. 62, pp.313-316.*
- SAVAGE, J.R.K , 1967, “Demonstrating cell division with *Tradescantia*” . *School Science Review* , v. 48, pp. 771–782.
- SAVAGE, J.R.K., 1990, “Mechanisms of Chromosome Aberrations, Mutation and the Environment, Part B” . *Wiley-Liss*, pp. 385–396.
- SAVAGE, J.R.K., 1975, “Radiation-induced chromosomal aberrations in the plant *Tradescantia*: dose–response curves:” *I. Preliminary considerations. Radiat. Bot.*, v.15, pp. 87–140.
- SPARROW, A.H., Underbrink, A.G., Rossi, H.H., 1972, “Mutations induced in *Tradescantia* by small doses of x-ray and neutrons: analysis of dose-response curves” . *Science* , v.176, pp. 916-918.
- SPARROW, A. H.; SPARROW, R.C., 1976, “Spontaneous somatic mutation frequencies for flowers color in several *Tradescantia* species and híbrids” . *Environmental and Experimental Botany*, v. 16, pp. 23-43.
- STEINITZ, L.M., 1944, “The effect of lack of oxygen on meiosis in *Tradescantia*” . *American Journal of Botany*, v. 31, pp. 428-443.
- SUMITA, N.M.; SAILI, M.; MENDES, M.E.; MACCHIONE, M.; GUIMARÃES, E.T.; LICHTENFELS, A.J.C.; LOBO, D.-J.A; AND SALDIVA, P.H.N., 2003, “*Tradescantia pallida* cv. *Purpurea Boom* in the Characterization of air pollution by

- acumulation of Trace Elements”. *Journal of the Air & Waster Management Association*, v. 53, pp. 574-579.
- SUYAMA, F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.-J.A.; RODRIGUES, G.S.; DOMIGOS, M.;ALVES, E.S.; CARVALHO, H.A. AND SALDIVA, P.H.N., 2002, “Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *Purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays”. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, v.35, pp.127-129.
- TANO, S., 1989, “ In situ detection of induced mutations with chemicals by *Tradescantia*”. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 14, n.º suppl. 15, pp. 197-199.
- TANO, S.,1990, “ In situ detection of induced mutations with chemicals by *Tradescantia*”. In: MENDELSON, M.L.; ALBERTNI, R.J. ed. *Mutation and the environment. New York: Wiley-Liss, Progress in Clinical and Biological Research*, v. 340, pp. 57-66.
- TAYLOR, J.H., 1950, “The duration of differentiation in excised anthers”. *American Journal of Biology*, v. 37, pp. 137-143.
- TAUHATA, L., 1991 “Apostila de Estatística”. Curso Estatística. CNEN. V. 1, pp.170.
- UNDERBRINCK, A.G., SPARROW, A.H.; SAUTKULIS, D.; MILLS, R. E., 1975A, “ An elusive factor affecting mutation frequency in *Tradescantia* stamen hair: its influence on RBE”. *International Journal of Radiation Biology*, v.28, pp. 527-538.
- UNDERBRINCK, A.G., SPARROW, A.H.; SAUTKULIS, D.; MILLS, R. E., 1975B, “Oxygen enhancement ratios (OERs) for somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs”. *Radiation Botany*, v.15, pp. 161-168.
- UNDERBRINCK, A.G.; SHAIRER, L.A.; SPARROW, A.H., 1973b, “*Tradescantia* stamen

hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis". In: *Hollaender, A., ed. Chemical mutagens – principles and methods for their detection. New York: Plenum Press, pp. 171-207.*

UNDERBRINK, A.G., SCHAIRER, L.A., SPARROW, A.H., 1973, "Tradescantia stamen hair: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis". *Chemical Mutagens: Principles and methods for Their Detection (Hollaender, A., ed.) 3, Plenum Press, New York, pp. 171-175.*

UNDERBRINK, A.G., SPARROW, A.H., 1974, "The influence of experimental endpoints, dose, dose rate, neutron energy, nitrogen ions, hypoxia, chromosome volume and ploidy level on RBE in Tradescantia stamen hairs and pollen". In: *Biological effects of neutron irradiation. Vienna: International Atomic Energy Agency, pp. 185-214.*

UNDERBRINK, A.G., SPARROW, A.H., ROSSI, H.H., 1970, "Relative biological effectiveness of x-rays and 0.43 Mev monoenergetic neutrons on somatic mutation and loss of reproductive integrity Tradescantia stamen hairs". *Radiation Research, v. 44, pp. 187-190.*

ANEXO I

❖ *Trabalhos aceitos em congresso.*

➤ SANTOS, T.C. ;GOMES, H.A.; MACACINI, J.F.; NOUAILHETAS, Y.; CRISPIM, V.R. “Study of response of the bioindicator system to low dose of ionizing radiation” 6th International Symposium on ESR Dosimetry and Applications, at Campos do Jordão, SP, Brasil. 12-16 October, 2003. (Resumo em evento internacional).

➤ SANTOS, T.C. ;GOMES, H.A.; CRISPIM, V.R. “Bioindicator in situ monitoring around the radioactive repository at Goiânia”. 6th International Symposium on ESR Dosimetry and Applications, at Campos do Jordão, SP, Brasil. 12-16 October, 2003. (Resumo em evento internacional).

➤ SANTOS, T.C. ;GOMES, H.A.; CRISPIM, V.R. Bioindicator (Trad-SHM) in situ monitoring around of the repository radioactive of Goiania”. IRPA 11 – Maio de 23 a 28 de 2004 Madri- Espanha, Apresentação : Pôster.

➤ SANTOS, T.C. ;GOMES, H.A.; CRISPIM, V.R. "Assays Using Systems Bioindicator for Radiation Gamma in Tropical Climate”. ICRS-10/RPS 2004, Madeira Island, 9-14 May 2004 – Apresentação : Oral

➤ SANTOS, T.C. ;GOMES, H.A.; CRISPIM, V.R. "Ambient Control of the Genotoxicity Of The Ionizing Radiation Using System Bioindicator”. IRPA 11 – setembro 06 a 10 de 2004 Aix-en-Provence – França, Apresentação : Pôster.

➤ SANTOS, Teresa Cristina; CRISPIM, Verginia Reis; NOUAILHETAS, Yannick. *Controle Ambiental Da Genotoxicidade Da Radiação Ionizante Usando Sistema Bioindicador*. In: VI ENAN – NATIONAL MEETING ON NUCLEAR APPLICATION, 2005, SANTOS – SP.

❖ ***Trabalho aceito em Periódico International.***

- SANTOS, T. C., GOMES, H.A.; CRISPIM, V.R 2005, “ The study of the effects of low dose level exposure to ionizing radiation using a bioindicator system” . *Applied Radiation and Isotopes, Issue 2, V. 62, pp.313-316.*
- SANTOS, Teresa Cristina; CRISPIM, Verginia Reis; NOUAILHETAS, Yannick. “Environment control of the genotoxicity of ionizing radiation using the bioindicator system”. *Low Radiation. In submission*
- SANTOS, T. C., GOMES, H.A.; CRISPIM, V.R 2005, “*The Study Of The Mutagenetical Effects of Low Dose Level Exposure To Ionizing Radiation Using a Bioindicator System Close to Deposits of Radioactive Waste. Applied Radiation and Isotopes. In submission*

Anexo II

➤ Unidades utilizadas no texto.

1. **Roentgen (R)** - unidade para medidas de exposição, está relacionada com a unidade do SI, Coulomb/kilograma($C.Kg^{-1}$), por; **$1R = 2,54.10^{-4} C.Kg^{-1}$** .
2. **Gray (Gy)** - unidade de dose absorvida, que esta relacionada com a unidade antiga rad (radiation absorbed dose); **$1 Gy = 100rad = 1 J.Kg^{-1}$** .
3. **Sievert (Sv)** - é uma unidade do SI para dose equivalente. A dose equivalente em sievert é igual para a dose absorvida em gray multiplicado por um fator de qualidade (radiation wighting factor; **$1 Sv = 100rems$** , onde rems é a unidade antiga para equivalente de dose.

➤ Relação entre Exposição e Dose Absorvda no ar

Sob condiçõesde equilíbrio, a exposição X, medida no ar, se relaciona com a dose absorvida D no ar, pela expressão (Tauhata,1999).

$$D_{ar} = X . (W/e)_{ar} = 0,876 . X$$

$(W/e)_{ar}$ = energia média para formação de um par de íons no ar/ carga do eletron = 0,876.