



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA REGIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**DESENVOLVIMENTO E MEIO AMBIENTE/PRODEMA**



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DA ÁGUA DO**  
**AÇUDE DE LUCRÉCIA (RN-BRASIL): UM ENFOQUE NA**  
**RELAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE**

**ANUSKA CONDE FAGUNDES SOARES GARCIA**

2011

Natal – RN

Brasil

**Anuska Conde Fagundes Soares Garcia**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DA ÁGUA DO  
AÇUDE DE LUCRÉCIA (RN-BRASIL): UM ENFOQUE NA  
RELAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE**

Dissertação apresentada ao Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PRODEMA/UFRN), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: **Profa. Dra. Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros**

Co-Orientador: **Profa. Dra. Viviane Souza do Amaral**

2011

Natal – RN

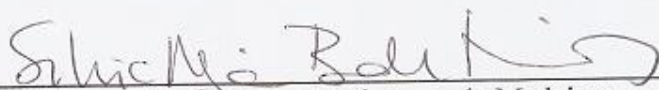
Brasil

## ANUSKA CONDE FAGUNDES SOARES GARCIA

Dissertação submetida ao Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PRODEMA/UFRN), como requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PRODEMA/UFRN)



Prof. Dra. Sandra de Souza Hacon  
Membro Externo (FIOCRUZ/RJ)



Prof. Dra. Magnolia Fernandes Florêncio de Araújo  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PRODEMA/UFRN)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado todas as virtudes por eu ter chegado até aqui;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida;

A Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), por ter sido a sede da realização desse sonho;

Ao PRODEMA e a todos os professores que o compõem, obrigada pela troca de conhecimento e pela vontade de construirmos juntos, um mundo melhor;

A professora Sílvia Batistuzzo, minha orientadora, por ter me aceitado para ser sua orientanda sem nem mesmo me conhecer pessoalmente e por ter tornado esse meu objetivo em realidade. Obrigada pela atenção, dedicação e pelo exemplo de profissional que és!;

A professora Viviane Souza do Amaral, minha co-orientadora, por todos os ensinamentos, por ouvir minhas aflições com os experimentos e o principal, obrigada pela amizade!;

Agradeço profundamente aos meus pais, Renato e Ana, que são tudo de mais preciosos nessa vida e a quem devo tudo que sou e tudo que consegui. Obrigada pelo amor incondicional e por sempre quererem o meu melhor!;

Ao meu irmão Yuri, pelos momentos de alegria e companheirismo;

A toda minha família que sempre me incentivou com gestos carinhosos, em especial aos meus avós paternos (*in memoriam*) Antônio Garcia Filho e Waldette Conde Garcia e maternos, Antônio Soares Neto e Terezinha Eida Fagundes Soares, que sempre serão fontes de inspiração e de ser humanos exemplares em que me espelho;

A todos os colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental (LAMA) e de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), pelo acolhimento, pelas ajudas constantes e por tornarem os meus dias mais alegres. Em especial gostaria de agradecer a Nilmara Alves, Marcos Felipe Galvão, Déborah Afonso e Jana Dara, pelas ajudas, pelos choros, pelas risadas, pelas conversas, enfim... Pela verdadeira AMIZADE que construímos durante esses dois anos e que levarei para sempre comigo! Agradeço também ao Alexandre, que sempre foi muito prestativo e me acompanhou nas coletas em Lucrécia, sendo de fundamental importância para a realização deste trabalho;

A todos os meus amigos PRODEMSSAS, Aninha, Cleuber, Rodrigo, Daisy, Suzana, Priscila, Wanessa, Vitória, Sebastião, Edilma, Jana, Jucicleide que compuseram, sem dúvidas, a turma mais unida e que me ensinaram que as diferenças, sejam elas de qualquer tipo, só nos fazem crescer enquanto seres humanos... Quantos momentos maravilhosos ficarão em minha memória! Quero deixar registrado aqui o meu agradecimento especial a Gláucia, Luiz Fernando e Patrícia, vocês conquistaram meu coração de uma forma inexplicável. Tenham certeza que vocês serão responsáveis por uma grande parcela das saudades que desde já começo a sentir...;

Ao enfermeiro Joniélio e a Lúcia, moradores de Lucrécia, que sempre foram muito prestativos e atenciosos quando estive por lá para realizar a pesquisa;

De uma forma geral, gostaria de agradecer a todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram nessa caminhada de 2 anos, com o seguinte trecho a seguir:

*“Aos que se tornaram familiares, aos que nasceram familiares e aos que conheci  
antes de ontem;*

*Aos que me deixaram louca e aos que enlouqueci;*

*Aos que me criticaram em tudo e a um ou outro que aturou minha chatisse;*

*Aos amigos que passaram e aos que estagnaram em mim;*

*Aos que me consideram muito e aos que com razão fizeram pouco;*

*Aos que conhecem o que penso e aos que só conhecem o que faço;*

*Aos que passam o dia todo comigo e aos que estão o tempo todo em mim.*

*Esse trabalho é a soma de todos vocês.*

*E se não é melhor, é por falta de memória, mas não por falta de amigos.”*

*(Efraim Rodrigues)*

## RESUMO

### Avaliação do Potencial Mutagênico do Açude de Lucrécia (RN-Brasil): Um Enfoque na Relação Saúde e Ambiente

A qualidade hídrica de diversos mananciais tem sido reduzida devido à percolação de contaminantes, seja de origem antrópica ou natural, aumentando consideravelmente o nível de compostos genotóxicos nos ecossistemas aquáticos. Tal fato vem contribuindo para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas, inclusive o homem. Diante deste cenário, está o açude de Lucrécia, que é um dos principais reservatórios hídricos superficiais, da região Semi-árida do Estado do RN, e que tem demonstrado contaminação por metais pesados, cianobactérias tóxicas e a presença natural do Radônio. Aliado a esses problemas, a população deste município vem apresentando elevada incidência de câncer associada popularmente ao consumo dessa água, sendo a prevalência cerca de três vezes maior, quando comparada a todo o Estado do Rio Grande do Norte. Visto isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial mutagênico da água superficial do açude de Lucrécia por meio do teste de micronúcleo em *Tradescantia pallida* e em cultura de Linfócitos Humanos, assim como identificar as concentrações de metais pesados presentes nesta água. A coleta de água foi realizada em dois pontos amostrais, no período de seca e no período chuvoso. Ademais, com o intuito de trazer um panorama mais completo da relação homem-saúde-ambiente nesta localidade, através do conhecimento do saber/agir ambiental dos moradores de Lucrécia, assim como o uso e percepções estes têm sobre o açude do seu município, foi realizado um estudo de Percepção Ambiental com os moradores locais. Os resultados obtidos para o teste de Micronúcleo, para ambos os modelos utilizados, mostraram resultados significantes para os pontos coletados. O período de seca apresentou uma média maior de micronúcleos quando comparado ao período chuvoso. Foi observado também concentrações acima do permitido pela legislação brasileira de alguns metais pesados. Com relação ao estudo de Percepção Ambiental com os moradores locais, a análise dos dados permitiu observar os conhecimentos sobre meio ambiente que os moradores possuem, assim como a forte ligação e as concepções que os mesmos possuem com o açude do município. Assim, a junção dessas duas vertentes (os testes de toxicidade genética realizados no açude desta cidade aliado a análise de percepção ambiental com os moradores de Lucrécia) permitiu traçar um diagnóstico mais completo sobre a situação local.

**PALAVRAS-CHAVE: Genotoxicidade, Teste do Micronúcleo, Percepção Ambiental**

## ABSTRACT

Evaluation of the mutagenicity potencial from the Lucrecia dam (RN-Brazil): A focus on the relationship between health and environment

The water quality of many reservoirs in the world has been reduced due to percolation of contaminants to water, which can have natural or anthropogenic origin, increasing the level of genotoxic compounds in aquatic ecosystems. This fact has contributed to the reduction of environmental quality, and commitment the health of living beings that inhabit these ecosystems, including the human population. In this backdrop of reduced water quality, is the Lucrecia dam, which is a major surface water reservoirs by volume of semi-arid region of Rio Grande do Norte, and that has shown contamination by heavy metals, cyanobacteria toxic and the natural presence of Radon. The population that use this source has been showing high rates of cancer, popularly associated with the consumption of this water, with a prevalence about three times higher compared to the whole state of Rio Grande do Norte. Based on this, the present study aimed to evaluate the mutagenic potencial of surface water from the Lucrecia dam, using the Micronucleus Test in *Tradescantia pallida* (Trad-MN) and in human peripheral blood lymphocytes (CBMN) assay, as well as identify the concentrations of some heavy metals in this water. Water samples were collected on a dry season and a rainy season, in two distinct points. Moreover, in order to bring a completely view about the relationship of man-health-environment in this local, through the knowledge of knowing / acting environmental from residents of Lucrecia, and the use and perceptions they have about the dam of your city, a study of Environmental Perception was carried out with local residents. The results obtained for the both micronucleus test, showed significant results for the three points analyzed. The strongest mutagenic effect was observed in the dry season for both assays. Chemical analyses detected an increase of heavy metal levels in different points and season above the maximum allowed by legislation. Regarding the study of Environmental Perception with local residents, it was observed the knowledge of the environment that the residents have, as well as the strong ties and perceptions with the dam of the city. Thus, the combination of these two aspects (the genetic toxicity tests conducted in the dam together with analysis of environmental perception with the residents of Lucrecia) allowed to draw a more complete diagnosis on the local situation.

**KEYWORDS: Genotoxicity, Micronucleus Test, Environmental Perception**

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

<b>Figura 1.</b> Modelo que ilustra as principais rotas pelas quais as toxinas afetam a estrutura genética das populações.....	14
<b>Figura 2.</b> Surgimento do Micronúcleo em células em divisão.....	17
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo do teste <i>ex situ</i> utilizando a <i>Tradescantia pallida</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Formação de células binucleadas devido ao bloqueio da citocinese pela citocalasina B. (a) Origem do micronúcleo devido à perda e a quebra cromossômica. (b) Formação de uma ponte nucleoplasmática e um micronúcleo.....	20
<b>Figura 5.</b> Os vários parâmetros que podem ser analisados através do ensaio de CBMN.....	21
<b>Figura 6.</b> Localização do Município de Lucrécia (RN-Brasil) e o seu açude.....	27
<b>Figura 7.</b> Bacia Hidrográfica Apodi/Mossoró e a localização do Açude de Lucrécia.....	29
<b>Figura 8.</b> Causas da mortalidade proporcional em todas as idades no Município de Lucrécia/RN.....	31
<b>Figura 9.</b> O açude de Lucrécia e a definição dos pontos de coleta da água.....	33
<b>Figura 10.</b> Experimento com a <i>Tradescantia pallida</i> em hidroponia.....	34
<b>Figura 11.</b> Cultura de sangue periférico após o tempo total de incubação.....	36

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> A localização do município de Lucrécia (Rio Grande do Norte) e o seu açude.....	49
<b>Figura 2.</b> Porcentagens dos participantes de acordo com o seu grau de escolaridade e a associação com as visões sobre os elementos que compõem o meio ambiente.....	52
<b>Figura 3.</b> Percentual de respostas dadas como relação a pergunta sobre as fontes de conhecimento sobre meio ambiente.....	52
<b>Figura 4.</b> Percentual de respostas referente a pergunta: Você acha que existem problemas ambientais na sua cidade?.....	53
<b>Figura 5.</b> Percentual de repostas com relação ao nível de satisfação com o meio ambiente do município.....	54
<b>Figura 6.</b> Percentual de respostas sobre os usos que os moradores de Lucrécia fazem do açude da cidade.....	55
<b>Figura 7.</b> Percentual das respostas sobre a qualidade da água do açude de Lucrécia.....	56
<b>Figura 8.</b> Percentual de respostas para a pergunta: Você acha que a água do açude pode prejudicar a sua saúde?.....	56
<b>Figura 9.</b> Percentual de respostas dadas a pergunta: Você consegue imaginar seu município sem o açude?.....	57

### CAPÍTULO II

<b>Figure 1.</b> Location of the Lucrecia dam study área in semi arid region of Rio Grande do Norte-Brazil.....	93
---	----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Percentual das respostas para cada um dos elementos (definidos no questionário) que fazem parte do meio ambiente.....51

**Tabela 2.** Problemas ambientais mais citados pelos participantes.....53

### CAPÍTULO II

**Table 1.** Physicochemical properties of water samples collected from Lucrecia dam.....88

**Table 2.** Concentrations (mg/L) of the metals measured in the water samples from different points at the Lucrecia dam and the maximum allowed values by CONAMA and WHO.....89

**Table 3.** Frequency of micronuclei obtained for *T. pallida* exposed to different points of the raw water samples from the Lucrecia dam.....90

**Table 4.** Frequency of micronuclei in human polymorphocytes and N.D.I. by different dilutions of the water samples from different points at the Lucrecia dam.....91

**Table 5.** Mutagenic response obtained by both micronucleus assays for raw water from Lucrecia dam.....92

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>13</b>
1.1 O TESTE DO MICRONÚCLEO.....	16
1.1.1 Teste do Micronúcleo em Tradescantia (Trad-MN).....	18
1.1.2 Teste do Micronúcleo em Linfócitos Humanos ( <i>Cytokinesis blocked</i> <i>micronucleus</i> - CBMN).....	20
1.2 PERCEPÇÃO AMBIENTAL.....	23
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....</b>	<b>27</b>
2.1 O AÇUDE DE LUCRÉCIA E SUA PROBLEMÁTICA.....	28
<b>3. METODOLOGIA GERAL.....</b>	<b>32</b>
3.1 METODOLOGIA PARA O ESTUDO DE PERCEPÇÃO AMBIENTAL.....	32
3.2 METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DA ÁGUA DO AÇUDE DE LUCRÉCIA.....	33
3.2.1 Coleta da água.....	33
3.2.2 Análise química da água.....	33
3.2.3 Teste do Micronúcleo em Tradescantia pallida (Trad-MN).....	34
3.2.4 Teste do Micronúcleo em cultura de Linfócitos Humanos (CBMN).....	35
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO I – Percepção Ambiental no Sertão do Estado do Rio Grande do Norte: Um Estudo de caso.....</b>	<b>46</b>
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Caracterização da área de estudo.....	48
2.2 Procedimento Metodológico.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1 Perfis etário, escolar e tempo de residência dos indivíduos.....	50
3.2 Questões relativas ao conhecimento sobre Meio Ambiente.....	51
3.3 Questões relativas ao açude de Lucrécia.....	54
4. CONCLUSÕES.....	57
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
<b>CAPÍTULO 2 – Study on Water Quality and Mutagenicity of A Surface Water From a Semi Arid Region by Micronucleus Assays.....</b>	<b>62</b>

1. INTRODUCTION.....	65
2. MATERIAL AND METHODS.....	66
2.1 Collection sites and sampling.....	66
2.2 Water Chemical Analyses.....	66
2.3 Tradescantia Micronucleus Assay.....	67
2.4 Lymphocyte culture and CBMN Assay.....	67
2.5 Statistical Analyses.....	68
3. RESULTS.....	69
3.1 Physicochemical and Heavy Metals Characterization.....	69
3.2 Tradescantia Micronucleus Assay.....	69
3.3 Lymphocyte culture and CBMN Assay.....	69
4. DISCUSSION.....	70
5. CONCLUSION.....	76
REFERENCES.....	77
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>101</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O impacto do ambiente na saúde humana é um dos principais objetos de estudo na sociedade contemporânea (TUBIANA, 2000). Muitos problemas enfrentados por alguns indivíduos, tais como, o surgimento de certas doenças crônico-degenerativas, podem ser reflexos de sua interação com o meio ambiente (GELLER e ZENICK, 2005). De fato, nos últimos anos, o homem vem aumentando expressivamente o descarte de seus dejetos, seja no solo, na água ou na atmosfera. Estas ações possibilitam que diferentes grupos de produtos químicos sejam liberados no ambiente, gerando estresse ambiental que pode afetar a atual e as próximas gerações de todos os seres vivos, incluindo o próprio homem.

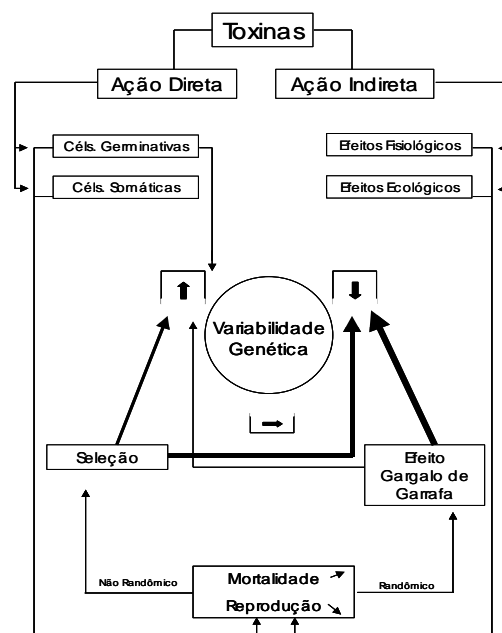
Dentre os ambientes afetados pela poluição, um dos mais preocupantes é o aquático, devido à água ser um bem mineral essencial as funções vitais dos organismos e, conseqüentemente, a manutenção da vida no planeta (LEME, 2007). O planeta Terra é o único do sistema solar que tem água nos três estados (sólido, líquido e gasoso), e as mudanças de estado físico da água no ciclo hidrológico são fundamentais e influem nos processos biogeoquímicos dos ecossistemas terrestres e aquáticos. Somente 3% da água do planeta está disponível como água doce. Destes 3%, cerca de 75% estão congelados em calotas polares, em estado sólido; 10% estão confinados nos aquíferos e, portanto, a disponibilidade dos recursos hídricos no estado líquido é de aproximadamente 15% destes 3%. A água, portanto, é um recurso extremamente reduzido (TUNDISI, 2003).

Além dessa questão da disponibilidade, outro ponto de fundamental importância, é que as águas superficiais, tais como rios e lagos, recebem grandes quantidades de efluentes, com ou sem tratamento, provenientes de atividades industriais, agrícolas e de fontes domésticas. Essas águas, que contêm muitos compostos desconhecidos, são usadas como fonte de água potável, bem como para fins agrícolas e atividades recreativas de todo o mundo (OHE *et al.*, 2004). Conseqüentemente, a poluição da água pode ser uma séria preocupação para saúde pública e para os ecossistemas aquáticos.

Desta forma, a sobrevivência das populações pode ser seriamente comprometida em função do volume e da composição dos dejetos lançados, já que estes contêm substâncias tóxicas com potencial de acumulação na cadeia alimentar (CLAXTON *et al.*, 1998; UMBUZEIRO e ROUBICEK, 2006). Portanto, mais do que garantir a quantidade de água disponível é imprescindível também avaliar a qualidade das fontes hídricas, já que estas são essenciais para o desenvolvimento econômico, para a qualidade de vida das populações humanas e para a sustentabilidade dos ciclos no planeta.

Em função disto, as agências de controle ambiental recomendam o emprego de testes de natureza biológica, química e física para a identificação de agentes tóxicos presentes nos

ecossistemas aquáticos. Uma série de estudos de toxicidade celular e genética de amostras ambientais demonstra que a exposição, em longo prazo, a genotoxinas impõe sérios riscos às populações que habitam os ecossistemas comprometidos. Estes poluentes podem alterar a constituição genética da população através da ação direta do agente tóxico com o material genético – efeitos genotóxicos – ou indireta, afetando tanto a fisiologia do organismo – efeitos fisiológicos - quanto modificando o ambiente no qual estes indivíduos residem – efeitos ecológicos. Tais contaminantes podem desencadear uma cascata de respostas, que incluem alterações: (i) em células germinativas e somáticas – associadas a doenças genéticas (CHATTOPADHYAY, 2010; ERICKSON, 2010); (ii) nas frequências alélicas; (iii) no sucesso reprodutivo e (iv) no tamanho populacional (BICKHAM *et al.*, 2000; DE WOLF *et al.*, 2004) (Figura 1).



**Figura 1.** Modelo que ilustra as principais rotas pelas quais as toxinas afetam a estrutura genética das populações. As alterações genéticas podem levar a aumento (↑), decréscimo (↓) ou efeito nulo na variabilidade genética das populações (→). A intensidade das setas é um indicativo da probabilidade de ocorrência dos eventos (setas diagonais representam aumentos ou decréscimos) (adaptado de: DE WOLF *et al.*, 2004).

Entretanto, a extensão destes efeitos não é apenas determinada pelas toxinas presentes no ambiente, mas depende tanto da concentração demográfica da população, do tempo da exposição e do potencial de adaptação a situações de estresse quanto de outras condições externas – podendo em conjunto determinar o destino de uma população (DE WOLF *et al.*, 2004). Como consequência, as estratégias utilizadas pelas entidades de controle ambiental buscam o emprego de uma bateria de testes biológicos, composta por diversos ensaios, selecionados para detalhar a ação tóxica genética de uma determinada amostra. De fato,

estudos recentes - utilizando diferentes bioensaios - revelam que as águas dos rios, de diversos países, vêm sendo constantemente contaminadas por uma gama de genotoxinas provenientes das descargas de origem antropogênica (BARBOSA *et al.*, 2010; BOETTCHER *et al.*, 2010; MATSUMOTO *et al.*, 2006; SUMMAK *et al.*, 2010). Estima-se que os compostos genotóxicos constituem pelo menos 5% dos poluentes derivados da ação antrópica em qualquer ecossistema (RAJAGURU *et al.*, 2001).

Uma das principais classes de substâncias químicas não degradáveis no ambiente, com capacidade de bioacumulação e persistência, e que aportam em sistemas aquáticos através de várias fontes, sejam elas naturais ou antropogênicas, é a dos metais pesados (MANAHAN, 1997) e a dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) (EL-SHAHAWI *et al.*, 2010). Muitos estudos demonstram que, em elevados níveis, os metais pesados podem causar efeitos tóxicos agudos e crônicos, tanto nos ecossistemas, como na saúde humana. Os efeitos prejudiciais de certos metais no DNA em plantas, animais e em seres humanos estão bem documentados e sabe-se que eles podem levar, por exemplo, à indução de câncer, a diminuição da fertilidade e problemas neurotóxicos (BARBOSA *et al.*, 2010; CROSSGROVE E ZHENG, 2004; GOYER, *et al.*, 2004, LU *et al.*, 2005; MAJER *et al.*, 2002). Essa ação é decorrente de dois mecanismos predominantes, a geração de danos oxidativos e a interferência com o reparo e a replicação do DNA (HARTWIG, 1995; JOSEPH, 2009; KASPRZAK *et al.*, 1999; REID *et al.*, 1994; UEDA *et al.*, 1998; VALKO *et al.*, 2006). O Cádmio, por exemplo, inibe sistemas enzimáticos responsáveis pela retirada e correção de lesões no DNA (BERTIN e AVERBECK, 2006; GIAGINIS *et al.*, 2006). Já o Níquel, pode alterar o padrão de expressão gênica via toxicidade epigenética, promovendo hipermetilação do DNA, levando ao silenciamento gênico (KASPRZAK *et al.*, 2003).

Já com relação aos POPs, estes podem ser divididos em intencionais, os quais são formados a partir de reações químicas com o cloro, por exemplo, diclorodifeniltricloreto (DDT) e os bifenis policlorados (PCBs); e não intencionais, que são representados por compostos indesejáveis da combustão ou de sub-produtos do cloro, como por exemplo, compostos de dioxina e furano e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (EL-SHAHAWI *et al.*, 2010). Os POPs vêm chamando grande atenção devido a sua capacidade de causar diversos efeitos adversos, como: câncer, problemas neurológicos, comportamentais e reprodutivos (SWEETMAN *et al.*, 2005). Uma das classes de POPs que gera grande preocupação é a dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). No ambiente aquático, esses hidrocarbonetos associam-se com partículas em suspensão e com sedimentos de fundo (FERNANDES *et al.*, 1997). Vários componentes deste grupo são capazes de reagir direta ou

indiretamente com o DNA, sendo amplamente caracterizados como eficientes mutágenos e carcinógenos (JOSEPHY *et al.*, 1997; YU, 2001).

A despeito das evidências que demonstram impactos genotóxicos em ecossistemas aquáticos, muitas substâncias são liberadas como misturas complexas, como é o caso dos resíduos lançados pelos efluentes urbanos e industriais. Estes são as principais fontes responsáveis por esta contaminação, pois estes resíduos são potencialmente tóxicos e sua presença pode degradar seriamente o ambiente (GANA *et al.*, 2008; JOLIBOIS e GUERBET, 2005). Adicionalmente, o impacto da atividade rural sobre o meio ambiente relaciona-se, basicamente, ao uso de pesticidas e herbicidas associados às atividades agrícolas. Tais compostos não apenas alteram a composição e a qualidade dos solos como, inevitavelmente, acabam por comprometer os corpos d'água adjacentes, expondo perigosamente os ecossistemas terrestres e aquáticos a diferentes contaminantes, muitos dos quais com propriedades genotóxicas (BORTOLI *et al.*, 2009; ENNACEUR *et al.*, 2008).

Coletivamente, esta gama de poluentes com potencial tóxico e/ ou genotóxico, interage entre si formando misturas ainda mais complexas que se distribuem nos corpos hídricos. Entre os aspectos a serem considerados nas interações químicas dessas misturas, estão os efeitos aditivos, sinérgicos e até mesmo antagonistas, que ocorrem como resultado da complexidade dos compostos químicos presentes, e que conferem características específicas as misturas formadas (MULLER *et al.*, 2002; VARGAS *et al.*, 2001).

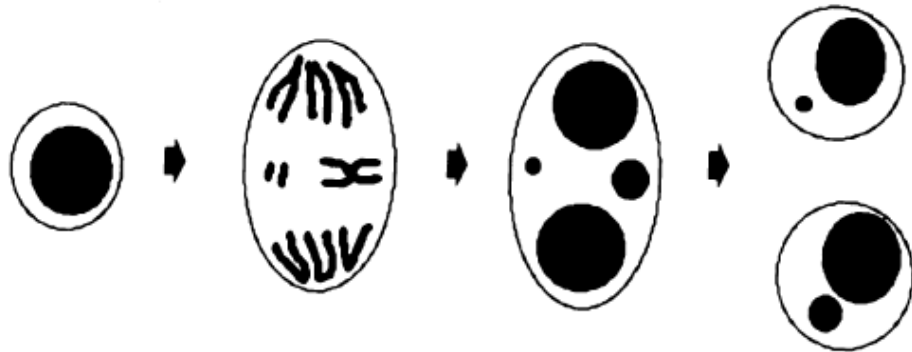
Assim, com o intuito de avaliar o risco genético imposto aos ecossistemas pelas misturas heterogêneas, diversas metodologias de detecção de genotoxicidade, como por exemplo, o teste de Micronúcleo, estão sendo empregadas para a análise dos efeitos tóxico-genéticos de amostras totais de origem urbana, industrial e/ou rural.

### **1.1 O TESTE DO MICRONÚCLEO**

Dentre os testes mais empregados para a avaliação da toxicidade genética associada a misturas complexas, destaca-se o teste do Micronúcleo.

Os micronúcleos são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular e, por isso, não são incluídos no núcleo das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (HEDDLE *et al.*, 1983; FENECH *et al.*, 1999) (Figura 2). Desta forma, a detecção de micronúcleos representa perda da cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico, sendo consideradas como mutações que são transmitidas as células, pois o dano genético se manifesta nas células filhas (BONASSI *et al.*, 2003; FENECH, 2000). A sua formação tanto pode ser induzida por substâncias que causam quebras cromossômicas (substâncias

clastogênicas) bem como por agentes que afetam o aparato do fuso mitótico (substâncias aneugênicas) (MAJER *et al.*, 2001).



**Figura 2.** Surgimento do Micronúcleo em células em divisão. A origem do micronúcleo tanto pode ser por perda de um cromossomo inteiro ou de um fragmento cromossômico na anáfase. Micronúcleos são facilmente identificáveis devido a sua morfologia menor, porém igual a do núcleo principal (adaptado de FENECH *et al.*, 1993).

Assim, um aumento na frequência de células com micronúcleos é usado como um biomarcador de efeitos mutagênicos em células animais ou humanas, visto que se manifestam em curto prazo após exposição e sua frequência se encontra elevada em tecidos expostos antes que qualquer sinal clínico seja evidente e, além disso, eles podem ser considerados como um marcador precoce para a carcinogênese (ALBERTINI *et al.*, 2000; BONASSI *et al.*, 2007; MONTERO *et al.*, 2006).

Comparado a outros ensaios de genotoxicidade, este teste apresenta muitas vantagens: (i) é um teste simples e rápido, em que as células podem ser obtidas facilmente sem precisarem ser cultivadas; (ii) a metodologia está bem definida e os eventos do micronúcleo podem facilmente ser identificados; (iii) as células podem ser fixadas e estocadas por grandes períodos de tempo; (iv) ao contrário da análise das trocas de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas estruturais, micronúcleos são encontrados na intérfase do ciclo celular; (v) a simplicidade de coletas de amostras por métodos não invasivos, tornando o teste aplicável a um grande número de amostras e (vi) custos relativamente baixos quando comparado a outros testes de genotoxicidade (HEDDLE, 1973; MATEUCA *et al.*, 2006).

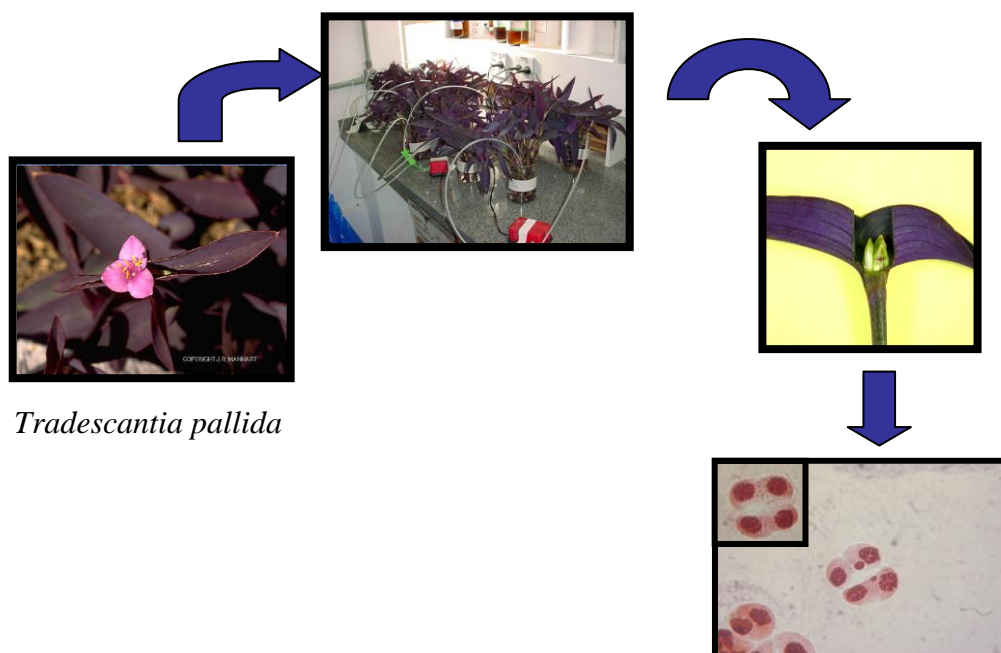
Para a realização desse teste, podem ser empregados diferentes tipos de células, como as vegetais, humanas e de outros mamíferos, desde que sejam células capazes de se dividir ou que seja possível induzir a divisão (FENECH, 2000).

### 1.1.1 TESTE DO MICRONÚCLEO EM *TRADESCANTIA* (TRAD-MCN)

Bioensaios utilizando modelos vegetais para detecção de agentes mutagênicos são, atualmente, reconhecidos como excelentes indicadores de danos cromossômicos induzidos por substâncias químicas presentes no ambiente. A *Tradescantia*, pertence à família Commelinaceae, sendo conhecida popularmente como Erva-de-fortuna ou Coração-roxo. É uma planta herbácea, que se encontra amplamente distribuída em todo o mundo, de fácil adaptação, com folhas e flores roxas e bastante ornamental (GUIMARÃES *et al.*, 2000).

Desde os primórdios dos estudos da atividade genética de compostos químicos e agentes físicos, várias espécies e clones do gênero *Tradescantia* têm sido utilizados como organismos experimentais, em virtude de uma série de características genéticas favoráveis. Apresentam apenas seis pares de cromossomos grandes e facilmente observáveis, células de quase todas as partes da planta, da ponta da raiz ao tubo polínico em desenvolvimento, fornecem material excelente para estudos citogenéticos (MA e GRANT, 1982).

O teste de micronúcleos em *Tradescantia* é baseado na visualização de segmentos de cromossomos individualizados (micronúcleo) no estágio da divisão celular de tétrade (Figura 3). Após a exposição a uma substância genotóxica, a frequência de micronúcleos observados aumenta. Devido a isso, este teste é um dos mais validados e tem sido considerado uma valiosa ferramenta por vários pesquisadores pela simplicidade da metodologia e sensibilidade desta planta a exposição aos genotóxicos. Portanto, ele tem sido usado em todo o mundo para o biomonitoramento ambiental, avaliando o potencial genotóxico tanto do ar, do solo, da água como também de substâncias químicas (GUIMARÃES *et al.*, 2000; GRANT, 1994; MARIANI *et al.*, 2009; MIELLI *et al.*, 2008; PRAJAPATI e TRIPATHI, 2008; STEINKELLNER *et al.*, 1999; SUYAMA *et al.*, 2002).



*Tradescantia pallida*

**Figura 3.** Esquema representativo do teste *ex situ* utilizando a *Tradescantia pallida*. Os talos com botões florais jovens são retirados das plantas e colocados em hidroponia com a substância a qual se deseja analisar. Após passado o tempo de exposição, os botões jovens são abertos, retirados os estames e, a partir deles, é preparada a lâmina. Na fotografia final, observa-se duas células em divisão no estágio de tetrade. A mais central apresenta dois micronúcleos, indicando a ocorrência de mutação.

Enfatizando a problemática da contaminação dos recursos hídricos, uma das grandes vantagens de usar esse teste para a avaliação de amostras de água, em comparação com os testes citogenéticos em culturas de células de mamíferos e os ensaios de mutagenicidade em bactérias, é o fato de que este organismo experimental pode ser exposto *in situ*, sem envolver qualquer processo de filtração ou de concentração, o que representa uma maior fidedignidade dos resultados (STEINKELLNER *et al.*, 1999).

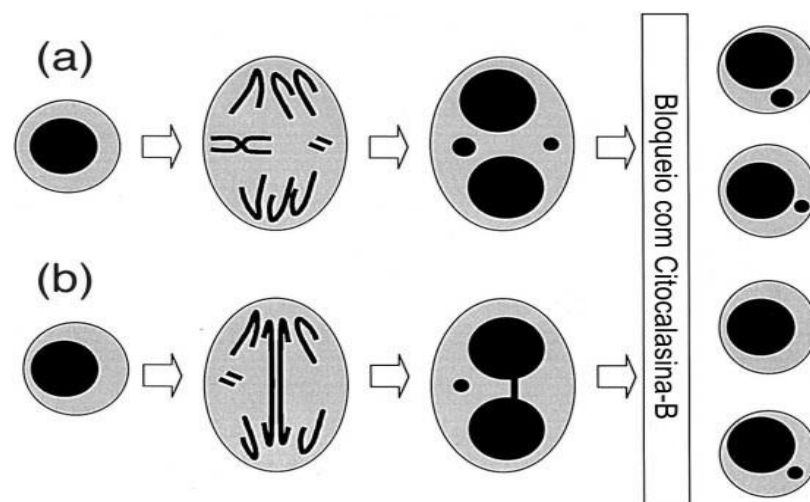
Através deste bioensaio, foram avaliadas amostras de água coletadas em quatro pontos do lago Hongzhe, que é um dos cinco maiores lagos da China e se localiza na província de Jiangsu. Além disso, também foi determinada a presença de alguns componentes, tais como: nitrogênio, fósforo, ferro, nitratos e oxigênio nestas amostras. Os resultados confirmaram que a quantidade de poluentes na água tem relação com a genotoxicidade em termos de danos cromossômicos. Dos quatro pontos coletados, três apresentaram níveis significativos de micronúcleos e foram justamente esses pontos onde foram constatados os maiores índices de nitrato e nitrogênio (YANG *et al.*, 1999). Ainda na China, Zeng e Lin (1999) determinaram os níveis de poluição de três rios que passam pela cidade de Fuzhou. Todas as amostras de água analisadas induziram níveis significativos de micronúcleos, quando testadas na sua forma bruta (sem diluição). Porém, quando foram diluídas a 50%, apenas uma amostra continuou apresentando índices significativos de micronúcleos quando comparado ao controle negativo. Esta mesma metodologia evidenciou toxicidade genética em 19 pontos dos 20 amostrados ao longo do rio Panlong (China), sendo que as frequências mais altas de micronúcleos foram observadas nos pontos mais próximos de efluentes industriais e municipais (DUAN *et al.*, 1999). Já Steinkellner *et al.* (1999), utilizaram este mesmo bioensaio para avaliar amostras provenientes dos dois principais rios da Áustria, Danúbio e Salzach, e demonstraram a ausência de substâncias com potencial clastogênico nestas amostras, já que não foi obtida diferença significativa na frequência de micronúcleos analisada em relação ao controle.

Apesar de vários estudos de genotoxicidade em águas, não há relatos no Brasil do uso do teste de micronúcleo em *Tradescantia* para este fim, sendo mais utilizado para o monitoramento do ar (ALVES, 2010; BATALHA *et al.*, 1999; CARMINITTI, 2008; CARVALHO-OLIVEIRA *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2003). Entretanto, como visto anteriormente e de acordo com Knasmuller *et al.* (2002), este teste pode ser eficiente para a avaliação de genotoxicidade na água e ser utilizado como uma nova ferramenta no Brasil,

sendo este trabalho um dos pioneiros. Assim, devido a sua versatilidade, praticidade e confiabilidade, o teste de micronúcleo em *Tradescantia* pode fornecer uma primeira indicação de alerta sobre a situação da qualidade da água sob condições reais e pode ser utilizado, juntamente com outros bioensaios e análises físico-químicas, para o monitoramento de ecossistemas ameaçados.

### 1.1.2 TESTE DO MICRONÚCLEO EM LINFÓCITOS HUMANOS (*Cytokines-blocked Micronucleus- CBMN*)

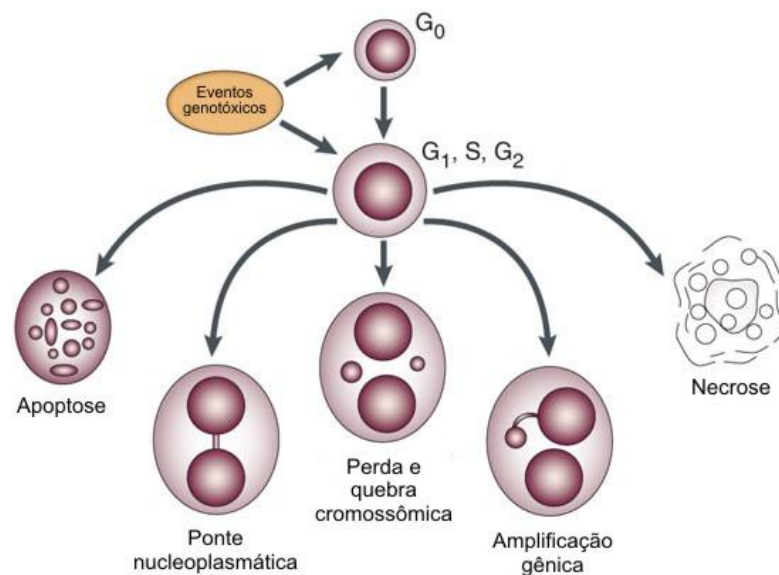
O uso de micronúcleos como uma medida do dano cromossômico em linfócitos do sangue periférico foi proposto pela primeira vez por Countryman e Heddle (1976) e posteriormente melhorado com o desenvolvimento do método do bloqueio da citocinese (*Cytokineis-Block Micronucleus/ CBMN*), o qual se baseia no uso da citocalasina B (CIT-B), conforme proposto por Fenech e Morley (1985), que é um agente inibidor da polimerização da proteína actina necessária para a formação do anel de microfilamentos que induz a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células-filhas - citocinese. O emprego da citocalasina B resulta em um acúmulo de linfócitos binucleados a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão (Figura 4). Havendo a formação de micronúcleos, eles também ficarão contidos no citoplasma. Desta forma, a análise em células binucleadas, permite uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas, já que seria necessário analisar o dobro de linfócitos mononucleados para observar o mesmo nível de lesões observados em binucleados (FENECH, 1997).



**Figura 4.** Formação de células binucleadas devido ao bloqueio da citocinese pela citocalasina B. (a) Origem do micronúcleo devido à perda e a quebra cromossômica. (b) Formação de uma ponte nucleoplasmática e um micronúcleo (adaptado de FENECH, 2007).

O teste de CBMN, além de detectar mutações cromossômicas, permite explorar também outros parâmetros citogenéticos tais como pontes nucleoplasmáticas, brotos nucleares, assim como a citotoxicidade associada à extensão e à progressão da divisão celular, através do Índice de Divisão Nuclear, além de apoptose e necrose celular (FENECH, 2000) (Figura 5).

As pontes são conexões entre os núcleos de uma célula binucleada, e são originadas de cromossômicos dicêntricos cujos centrômeros são separados para pólos opostos da célula durante a anáfase (FENECH, 2000; FENECH *et al.*, 2003). Já os brotos são decorrentes da eliminação de DNA amplificado. Com relação ao índice de divisão nuclear (NDI), este é um parâmetro útil para analisar a resposta mitogênica ou citostática dos linfócitos devido aos efeitos dos agentes testados no ensaio. Por fim, a apoptose e necrose representam vias diferentes de morte celular, que são importantes para a descrição precisa do mecanismo de ação e a quantificação da sensibilidade celular a alguma radiação ou químico (FENECH, 2000).



**Figura 5.** Os vários parâmetros que podem ser analisados através do ensaio de CBMN (adaptado de FENECH, 2007).

A inclusão desses marcadores de danos cromossômicos no ensaio do CBMN, juntamente com micronúcleo (MN), permite uma melhor e maior quantificação de eventos complementares importantes de genotoxicidade e citotoxicidade, no âmbito da aplicação desse teste para mensurar quebras cromossômicas, perdas cromossômicas, rearranjos cromossômicos, amplificação gênica e efeitos citostáticos ou proliferativos da célula (FENECH *et al.*, 2003).

A quantificação da frequência de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico humano tem sido extensivamente utilizada na epidemiologia molecular e citogenética para avaliar a presença e a extensão de danos cromossômicos em populações humanas expostas a agentes genotóxicos ou que possuem um perfil genético susceptível (FENECH *et al.*, 1999). Isso se deve ao fato deste biomarcador ser preditivo ao risco de câncer em humanos (BONASSI *et al.*, 2007).

A relação entre a indução de MN e o desenvolvimento do câncer é apoiada por inúmeras observações, tais como: (i) uma maior frequência deste biomarcador em pacientes com câncer não tratados e indivíduos afetados por doenças congênitas propensas ao câncer, como a ataxia telangiectasia; (ii) a presença de frequências elevadas de micronúcleos na mucosa oral, utilizada como biomarcador de câncer em exames quimiopreventivos; (iii) a correlação existente entre agentes genotóxicos indutores de micronúcleos e carcinogênese, por exemplo, radiação ionizante e ultravioleta; e (iv) a correlação inversa entre a frequência de MN e a concentração sanguínea e/ou dieta ingerida de certos micronutrientes, associados com risco reduzido de câncer, tais como folato, cálcio, vitamina E e o ácido nicotínico (BONASSI *et al.*, 2007).

Diante da sua aplicabilidade, esse teste tem sido empregado nas áreas de ecotoxicologia (GAUTHIER *et al.*, 1999), nutrição (FENECH e RINALDI, 1995; FENECH e FERGUSON, 2001), biomonitoramento de populações humanas (BONASSI *et al.*, 2007; EL-ZEIN *et al.*, 2006; FENECH *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2009), epidemiologia molecular (FALCK *et al.*, 1999; NORPPA, 1997) e principalmente na identificação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (ANUPAMA *et al.*, 2008; HAMZA e MOHANKUMAR, 2009; KIRSCH-VOLDERS, 1997; KRISHNAJA *et al.*, 2008), assim como em amostras de origem ambiental (AMARAL, 2005; EL ASSLOUJ *et al.*, 2009; KADMIRI *et al.*, 2006; LEMOS e ERDTMANN, 2000).

Amaral (2005) avaliou amostras de água superficial coletadas em 8 pontos distribuídos na Região Hidrográfica do Guaíba, Rio Grande do Sul (Brasil), que sofrem influência de atividade agrícola, urbana e/ou industrial. Foram realizadas 4 coletas, em diferentes estações do ano. Dos 8 pontos amostrados, 7 induziram a um aumento significativo de micronúcleos em linfócitos humanos quando comparados ao controle negativo.

Ainda utilizando este mesmo bioensaio, Lemos e Eardtman (2000) avaliaram a genotoxicidade do rio Caí, em Porto Alegre, o qual está sob influência do Complexo Petroquímico do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). O local de estudo foi dividido em 4 pontos de coleta, sendo A = local acima do complexo, B = engloba a área de efluentes tratados do complexo e também é influenciado pelos materiais sólidos do despejo, C = perto

da área de escoamento intermitente de efluentes tratados e D = é o local de acumulação. As coletas foram realizadas mensalmente durante um período de 20 meses. Os resultados apontaram que o ponto B foi o local onde os índices de micronúcleos foram significativamente maiores seguidos pelos pontos A, D e C, respectivamente. Foi observado neste estudo que as frequências mais altas de micronúcleos foram observadas nos períodos do verão, em relação ao inverno, possivelmente devido a uma maior concentração dos poluentes.

Já na cidade de Settat, em Marrocos, foi avaliado, por esse mesmo teste, o rio Boumoussa, o qual recebe efluentes industriais e esgotos não tratados. A cultura celular do sangue periférico foi tratada com 50 µl, 100 µl, 200 µl e 400 µl da água bruta proveniente desse rio. Os resultados demonstraram que a frequência de micronúcleos aumentou com o aumento do volume de água adicionada nas culturas. Além disso, eles avaliaram também o Índice de Divisão Nuclear, cujo resultado mostrou uma relação dose-dependente de decréscimo do índice com o aumento do volume da água, alertando para o potencial genotóxico e citotóxico dessas amostras coletadas (EL ASSLOUJ *et al.*, 2009).

De fato, o ensaio de CBMN em linfócitos humanos revela-se altamente sensível para detectar substâncias clastogênicas ou aneugênicas, presentes no meio aquático, e tem sido usado com sucesso, no intuito de monitorar áreas sob influência de contaminantes.

Visto a aplicabilidade dos testes de Micronúcleo em *Tradescantia* e em Linfócitos Humanos em amostras de origem ambiental, justifica, portanto, a escolha destes ensaios para a avaliação do potencial mutagênico da água do Açude de Lucrécia, no Rio Grande do Norte - Brasil. Os dados oriundos destas metodologias permitirão traçar um perfil acerca dos fatores que estão interferindo na saúde dos organismos e /ou alterando as condições do próprio ambiente.

## 1.2. PERCEPÇÃO AMBIENTAL

Projetos que tratam da relação homem-ambiente e do gerenciamento de ecossistemas devem incluir estudos de investigação da percepção dos grupos sócio-culturais interatuantes como parte integrante da abordagem interdisciplinar que estes projetos exigem (DIEGUES, 2001, MAROTI *et al.*, 2000; SILVA, 2009).

Sabe-se que o homem exerce sua influência sobre a natureza e dela retira recursos para assegurar sua sobrevivência e rejeita aquilo que não lhe é mais útil. Entretanto, diferentemente de outras espécies, o homem culturaliza a natureza, imprime-lhe uma simbologia, uma representação, a fim de torná-la inteligível a sua compreensão. Nesse contexto, o ser humano é criatura e criador do seu ambiente (VIOLANTE, 2006).

Segundo Serra (2006), o ambiente é fundamental para a formação da cultura e do tipo de vida do grupo humano que nele se instala, é a base física da sociedade formada, na qual interage com os fenômenos climáticos que ocorrem nesse meio e com os recursos naturais disponíveis. Para Elali (2003), o ambiente é mais do que base física a partir e por meio da qual a pessoa recebe informações (visuais, táteis, térmicas, auditivas e/ou olfato-gustativas), ele é um agente continuamente presente na vivência humana. A apreensão, compreensão e o uso do meio ambiente pelo ser humano e as relações entre a pessoa e o local onde se encontra devem-se tanto às características biológicas da espécie (bípede ereto cujos principais órgãos sensoriais estão voltados para a parte frontal do corpo, dotado de estereoscopia visual e auditiva, e que diferencia direita-esquerda, acima-abaixo, trás-frente, etc.), quanto às características e vivências próprias do indivíduo e do grupo etário e social no qual se insere.

Assim, o laço entre homem e natureza é construído não só dos conceitos que o ser humano tem sobre o meio ambiente, mas de outros inúmeros aspectos inerentes à sua natureza, desde os mais rudimentares (instintivos) até os associados à sua complexa evolução biológica e cultural (linguagem, afetividade, imaginação, intuição, arranjo social, etc.) (MARIN *et al.*, 2003). Ainda segundo esta última autora, a interação do ser humano com o ambiente, solidificada em bases tão complexas, tem representado um estímulo para pesquisas de percepção ambiental. Essa percepção tem sido estudada, na maioria dos casos, mediante o levantamento de conceitos de meio ambiente e dos referentes a fenômenos e problemas ambientais.

O conceito de Percepção Ambiental utilizada nesse estudo é o mesmo adotado pelo programa Man and Biosphere (MAB) da UNESCO: uma tomada de consciência e a compreensão pelo homem do meio ambiente no sentido mais amplo, envolvendo bem mais que uma percepção sensorial individual, como a visão ou a audição (WHYTE, 1978). Integra elementos da psicologia, da geografia, da biologia, da antropologia, entre outras ciências, tendo como objetivo principal o entendimento dos fatores, os mecanismos e os processos que levam o ser humano a possuir percepções, usos e comportamentos distintos em relação ao meio ambiente (MARCZWISKI, 2006).

Apesar de ser um conceito relativamente novo, a Percepção Ambiental, tem sido cada vez mais utilizada, tanto nas ciências humanas e sociais quanto nas ciências biológicas, como um instrumento de investigação das relações do homem com o ambiente ao seu redor (VIOLANTE, 2006), assim como dos usos que o homem faz do meio ambiente em que está inserido.

Quando o ser humano reflete sobre sua relação com o ambiente, ele procura o entendimento de suas percepções e se questiona sobre seu lugar na paisagem percebida,

tornando possível a avaliação de suas ações no ambiente (MARIN *et al.*, 2003). Com isso, pesquisas avaliando a percepção ambiental dos indivíduos podem também ser instrumentos educativos e transformadores (SANTOS *et al.*, 2000) desde que propiciem as condições para reflexão do próprio indivíduo. De acordo com Faggionato (2002), saber como os indivíduos percebem o ambiente em que vivem, suas fontes de satisfação e insatisfação e sua inter-relação com o local ao qual está inserido, é de fundamental importância, pois só assim, conhecendo a cada um, será possível a realização de um trabalho com bases locais, partindo da realidade do público alvo.

Whyte (1978) ressalta que projetos de percepção ambiental contribuem para a utilização mais racional dos recursos naturais, possibilitam a participação da comunidade no desenvolvimento e planejamento regional através do registro e preservação das percepções e dos sistemas de conhecimento do ambiente, bem como proporcionam uma interação harmônica do conhecimento local (do ponto de vista do indivíduo, da população e da comunidade) com o conhecimento do exterior (abordagem científica tradicional) enquanto instrumento educativo e de transformação.

Desta forma, pesquisas de Percepção Ambiental funcionam como instrumento diagnóstico da situação de uma determinada comunidade em relação ao seu saber/agir ambiental e, além disso, se tornam parte primordial para futuros projetos de educação ambiental, já que esse diagnóstico é capaz de identificar as necessidades, as expectativas e as relações que essas pessoas estabelecem com o meio ambiente da sua localidade.

Visto a importância da junção da vertente biológica e da vertente social no sentido de trazer um panorama mais completo no gerenciamento da relação homem-saúde-ambiente em determinados locais, esse trabalho propõe-se a avaliar e ajudar a esclarecer o potencial mutagênico da água do açude de Lucrecia (RN- Brasil), através do teste de Micronúcleo em *Tradescantia pallida* e em Linfócitos humanos, além de fazer um estudo de percepção ambiental com a população local para se obter um diagnóstico da situação dessa comunidade em relação ao seu saber/agir ambiental e as concepções que possuem a respeito do meio ambiente que as rodeia, incluindo o açude do município. Dessa forma, este trabalho figurar-se-á como um valioso instrumento condutor de transformação mais adequado as necessidades prementes.

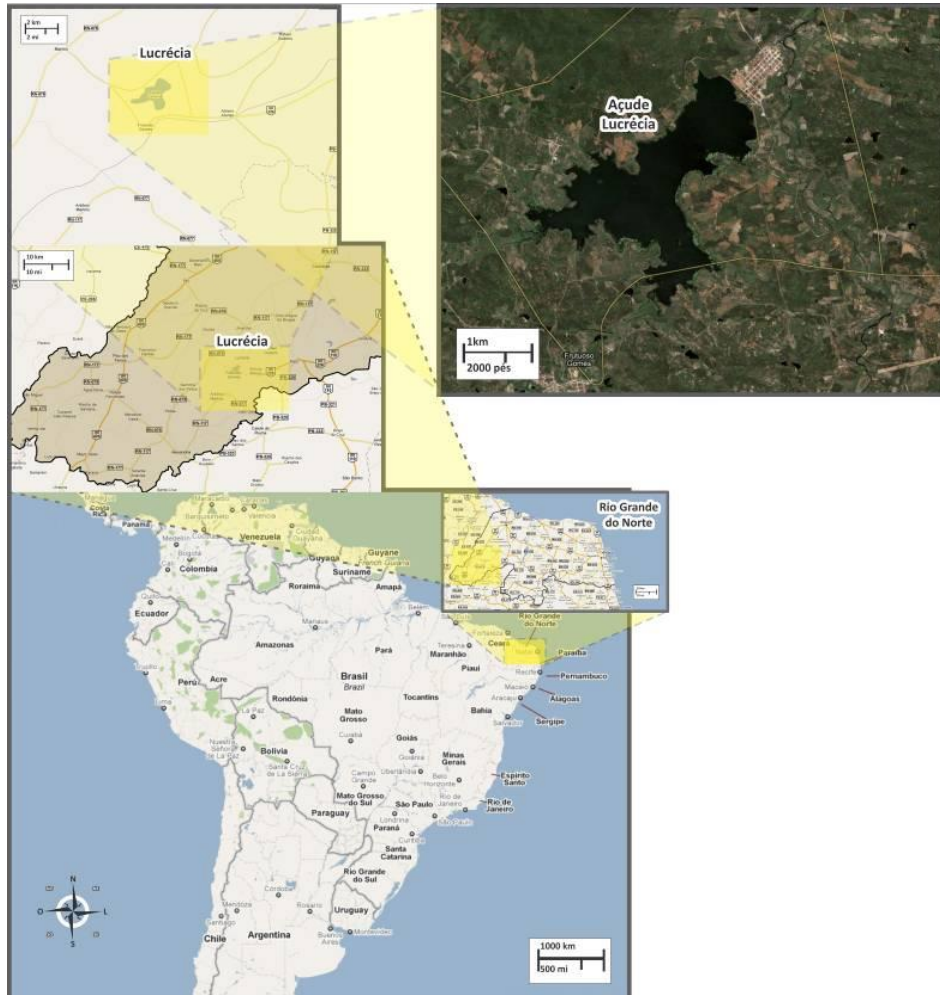
Assim, almeja-se que a importância deste projeto possa ser avaliada pela ótica da Ciência, na medida em que contribui para o aumento do conhecimento científico baseado no incremento dos estudos, dos métodos e testes aplicados, que resultam na detecção prévia e segura dos danos causados pelo consumo da água do açude de Lucrecia, principalmente na correlação com a alta frequência de casos de câncer na população.

Logo, espera-se que as futuras aplicações práticas advindas dessa investigação, possam sensibilizar não só a população local, mas principalmente as autoridades em nível local e regional, para que medidas de políticas em saúde pública possam ser efetivadas, trazendo melhorias para a prevenção, recuperação e a manutenção da qualidade de vida do município. Dessa forma, ciência, governo e população juntos podem realizar ações que certamente terão como resultados uma melhor qualidade de vida local, com mais saúde pública e consciência sócio-ambiental.

Em atendimento aos objetivos e conforme padronização estabelecida pelo Programa, esta Dissertação se encontra composta por esta Introdução geral, seguindo pela caracterização geral da área de estudo, metodologia geral empregada para o conjunto da obra e por dois capítulos que correspondem a artigos científicos a serem submetidos à publicação. O Capítulo 1 intitulado “Percepção Ambiental no Sertão do Estado do Rio Grande do Norte: Um estudo de caso” foi submetido à Revista Educação Ambiental em Ação e, portanto, está formatado conforme este periódico (Normas no anexo A); O Capítulo 2 intitulado “Study on Water Quality and Mutagenicity of a Surface Water from a Semi-Arid Region by Micronucleus Assays” será submetido ao periódico Science of Total Environment e, portanto, está formatado conforme este periódico (Normas no anexo C). Ao final será apresentada a Conclusão Geral.

## 2. CARACTERIZAÇÃO GERAL DA ÁREA DE ESTUDO

O município de Lucrécia situa-se no Estado do Rio Grande do Norte (Brasil), na mesorregião Oeste Potiguar e na microrregião Umarizal (Figura 6), limitando-se com os municípios de Umarizal, Martins, Frutuoso Gomes e Almino Afonso, abrangendo uma área de 27 km<sup>2</sup>.



**Figura 6.** Localização do Município de Lucrécia (RN-Brasil) e o seu açude.

Segundo o censo de 2000, a população total residente é de 3.218 habitantes, dos quais 1.586 são do sexo masculino (49,30%) e 1.632 do sexo feminino (50,70%), sendo que 1.932 vivem na área urbana (60,00%) e 1.286 na área rural (40,00%). Segundo a última contagem populacional feita pelo IBGE em 2009, o município apresenta uma população estimada de 3.550 habitantes.

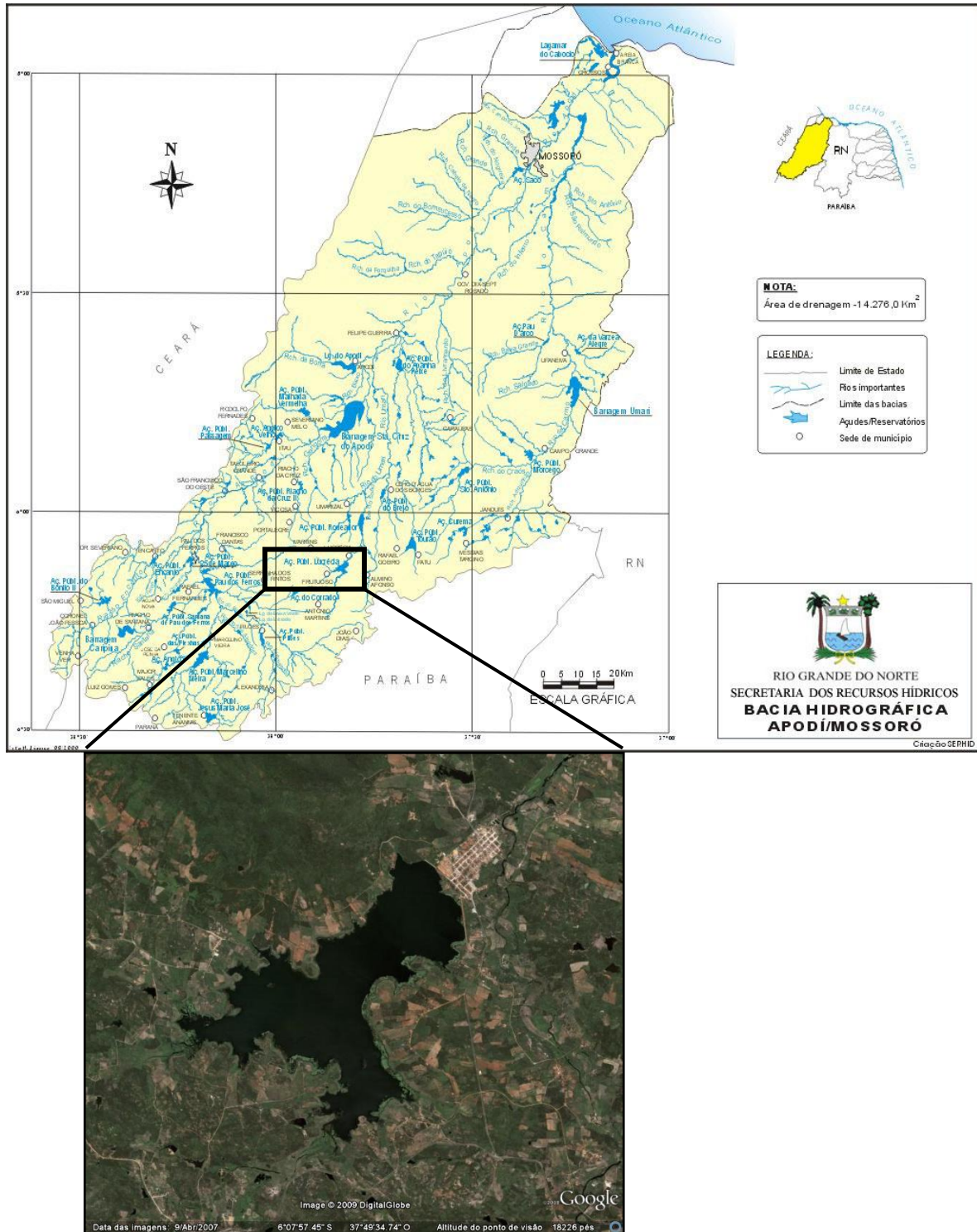
De acordo com os dados da Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte (SESAP), a rede de saúde de Lucrécia dispõe de 01 Hospital, 02 Centros de Saúde, 03 Postos de Saúde e 12 leitos. Na área educacional, o município possui 8 estabelecimentos de ensino, sendo 03 de ensino pré-escolar, 05 de ensino fundamental e 01 de ensino médio. Da população total, 73,80% são alfabetizados.

Dentre as principais atividades econômicas do município estão a agropecuária, o extrativismo e o comércio.

Com relação aos seus aspectos fisiográficos, este município caracteriza-se por clima sub-úmido com precipitações pluviométricas em torno de 931,6 mm. O período chuvoso concentra-se de Fevereiro a Maio e a umidade relativa média anual é de 66%. A temperatura média anual é de 28,1 °C, com 2.700 horas de insolação. A formação vegetal é do tipo caatinga hiperxerófila que apresenta caráter mais seco com abundância de cactáceas e plantas de porte baixo e espalhadas. Já o tipo de solo predominante é o podzólico vermelho amarelo equivalente eutrófico, com alta fertilidade, textura média, acentuadamente drenado e relevo suave e ondulado. A hidrografia da região encontra-se totalmente inserida nos domínios da bacia hidrográfica Apodi-Mossoró, sendo banhado apenas por cursos d' água secundários e intermitentes, sem maior expressão. Na porção Sul existe um açude público de grande porte, que abastece a sede do município, o Açude Lucrécia (Ministério de Minas e Energia, 2005).

## **2.1 O AÇUDE DE LUCRÉCIA E SUA PROBLEMÁTICA**

O açude de Lucrécia encontra-se a 500 m ao Sul do município de Lucrécia, fazendo parte da bacia hidrográfica Apodi-Mossoró (Figura 7). Ele foi construído com a finalidade de suprir as necessidades de abastecimento humano e irrigação, e teve sua construção concluída no ano de 1934. É do tipo “terra compactada”, possuindo área de 528,27 ha, correspondendo a uma bacia hidráulica de capacidade máxima em armazenamento de 27.270.000,00 m<sup>3</sup>. As cidades de Frutuoso Gomes, Lucrécia e Martins são abastecidas por ele (SERHID, 2001).



**Figura 7.** Bacia Hidrográfica Apodi/Mossoró e a localização do Açude de Lucrécia. **FONTE:** adaptado de SEMARH, 2009 e Google Earth.

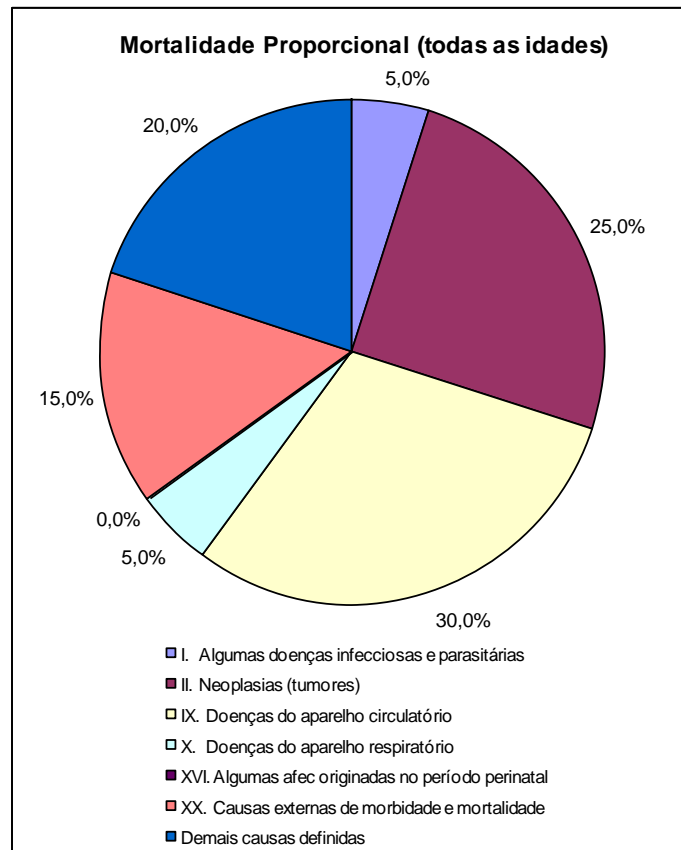
Além das descargas antropogênicas que recebe em função do despejo de efluentes domésticos pela população e da contaminação causada por agrotóxicos, esse açude tem demonstrado contaminação também por metais pesados e cianobactérias tóxicas (COSTA *et al.*, 2006; MARCON *et al.*, 2008, 2010; SERRA, 2006).

Esse reservatório encontra-se frequentemente reduzido devido a escassez de chuva, e em 2001 apresentou 58% a menos da sua capacidade máxima de armazenamento, resultando na eutrofização das águas e na concentração de poluentes (principalmente os metais) oriundos dos efluentes agropecuários, domésticos e da lixiviação do solo cristalino (SERRA *et al.*, 2006).

Agravando ainda mais a situação, essa região apresenta incidência natural do Radônio, o qual é considerado a fonte mais importante de exposição humana a radiação (LUTZE *et al.*, 1992, MALANCA *et al.*, 1997). O Radônio é um gás nobre radiativo, pesado, incolor, inodoro, insípido e solúvel na água, que se origina do Rádio (um membro das séries de decaimento do Urânio e Tório) e está presente naturalmente no meio ambiente em rochas, solos, águas e ar. Porém, diferentemente dos outros gases nobres, ele não é completamente inerte, pois pode formar alguns complexos químicos. A sua ocorrência na natureza é controlada por variáveis físicas, tais como a pressão, temperatura, emissividade pelas rochas, assim como pelo tempo e pela geoquímica dos seus progenitores (FAURE, 1991; MARQUES *et al.*, 2006). O Radônio produz partículas alfa, que são radiações de alta transferência de energia linear que causam permanentes lesões ao DNA, como as quebras cromossômicas, e devido a isso, geram grande preocupação ao meio ambiente. Baseada em evidências de exposição humana e animal, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), classificou o Radônio como do grupo 1 dos cancerígenos (HAMZA e MOHANKUMAR, 2009; VILLALOBOS-PIETRINI *et al.*, 1999). Em um recente trabalho de medição de Radônio em Lucrécia, foram colocados 110 detectores passivos desse gás distribuídos em algumas residências do município, em dois períodos da estação seca (Dezembro 2009/ Fevereiro 2010). Em ambos os períodos, o “radônio interior” variou entre 40-7679 Bq/m<sup>3</sup>, com mediana de 237 Bq/m<sup>3</sup>. Isso demonstra que a grande maioria das habitações apresentou resultados que excederam o nível de ação da Organização Mundial de Saúde – OMS (2009) que é de 100 Bq/m<sup>3</sup> (CAMPOS *et al.*, 2010). Além desses resultados para o ar, no trabalho de Marcon *et al.* (2010), onde foi realizada a medição de partículas alfa e beta na água, em dois pontos do açude, os resultados também apresentaram níveis acima do valor permitido pela portaria n° 518 do Ministério da Saúde.

O dado mais preocupante e que merece destaque, é que os municípios que se utilizam desse açude apresentam um histórico de elevada incidência de câncer associada popularmente ao consumo da água do açude de Lucrécia. Esta região apresenta prevalência de câncer cerca de três vezes maior, quando comparada a todo o Estado do Rio Grande do Norte. Entre a maior incidência, está o câncer na via digestiva (BAPTISTA *et al.*, 2005; INCA, 2007; SERRA, 2006). Segundo dados do DATASUS (2008) (Figura 8), uma das maiores causas de

mortalidade proporcional em todas as idades nesse município é de neoplasias, chegando a 25% do total da população.



**Figura 8.** Causas da mortalidade proporcional em todas as idades no Município de Lucrécia/RN. **FONTE:** DATASUS, 2008.

No ano de 2007, as estatísticas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimaram taxas brutas de incidência de casos de câncer por 100.000 habitantes na ordem de 228,9 para o Estado do Rio Grande do Norte e, 363,5, para a capital Natal. A taxa bruta de incidência por 100.000 habitantes na área de estudo demonstra números elevados para o município de Lucrécia – 776,88 casos, Frutuoso Gomes – 480,35 casos e Martins 517, 80, enquanto que em Almino Alfonso, este número é de 174,35.

Os três municípios de maior incidência de casos têm abastecimento de água proveniente do Açude de Lucrécia, alimentando a crença na população local que relaciona a alta incidência de habitantes acometidos com câncer com a utilização da água proveniente deste açude.

Através de alguns bioensaios já realizados, foi possível averiguar um indicativo de genotoxicidade para a água deste açude. No laboratório de Mutagênese Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, no período de 2007, foi realizado o teste

Cometa, com o extrato orgânico da água do açude, e o Teste de Micronúcleo em peixes (*O. niloticus*). Ambos os testes apresentaram resultados positivos em relação aos seus respectivos controles negativos. Além disso, foram também realizadas neste mesmo período, análises de metais em dois pontos do açude, as quais demonstraram que os níveis de Cádmio, Cobre, Manganês, Zinco, Cromo e Níquel estavam acima do permitido pelo CONAMA (MARCON *et al.*, 2010).

### **3. METODOLOGIA GERAL**

#### **3.1. Metodologia utilizada para o estudo de Percepção Ambiental**

Para esse estudo, foram aplicados 100 questionários (ver Apêndice A) de acordo com a amostra aleatória probabilística, utilizando um erro amostral de 10% e um índice de confiança de 95%, os quais foram dirigidos aos moradores de Lucrécia maiores de 18 anos, de qualquer etnia racial, grupo e/ou classe social. O protocolo para essa pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Ver Apêndice B).

A escolha dos indivíduos foi aleatória e feita da seguinte forma: Foram escolhidas casas aleatórias no município para que o questionário pudesse ser realizado com um indivíduo de cada casa. Os indivíduos que por algum motivo não quisessem participar da pesquisa, tiveram plena liberdade em fazê-lo. Neste caso, este indivíduo não fez parte da amostragem e um novo indivíduo foi arrolado, podendo ser da mesma casa ou de uma nova casa amostrada. No momento em que os indivíduos foram convidados a participar, foram apresentadas informações sobre a pesquisa (objetivos, riscos, benefícios, e procedimentos aos quais serão submetidos). Confirmado o desejo de participar voluntariamente da pesquisa, foi entregue uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Ver Apêndice C), para que fosse lido seu conteúdo, entendido e esclarecidas quaisquer dúvidas. Só então, com a assinatura do termo é que foi formalizada a participação do indivíduo na pesquisa. Para os indivíduos que afirmaram ser analfabetos, todo o procedimento foi feito de forma oral, inclusive a aplicação do questionário.

Com relação à elaboração do questionário, o mesmo se deu através de levantamento bibliográfico sobre percepção ambiental, sendo que foram feitas adaptações, tendo em vista o foco de interesse da pesquisa em questão. A estrutura do mesmo foi montada de forma a contemplar informações em três enfoques: I. Informações pessoais; II. Questões relativas ao conhecimento sobre meio ambiente; III. Questões relativas ao açude de Lucrécia.

A partir dos dados obtidos, foram realizadas análises quantitativas e qualitativas dos dados. Para esta análise quantitativa foi utilizada a análise simples (porcentagens), por meio

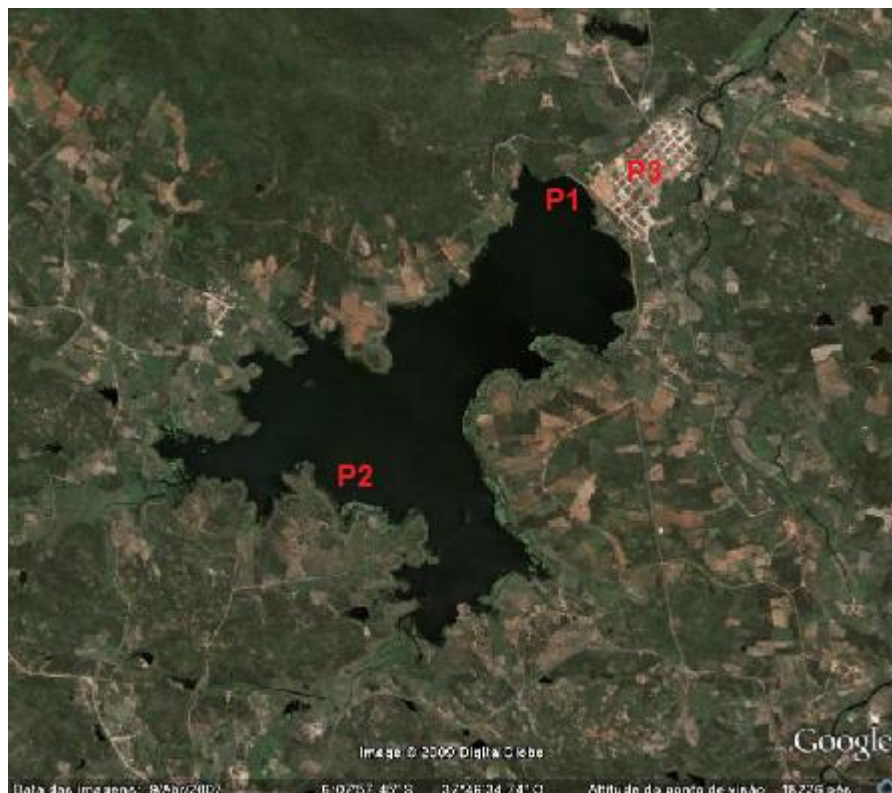
do software Excel para a tabulação dos dados. Já para análise qualitativa, os dados foram analisados e expressos em categorias de acordo com as respostas dadas.

### 3.2. Metodologia utilizada para a avaliação mutagênica da água do Açude de Lucrécia

#### 3.2.1. Coleta de água no açude

As coletas de água do açude foram realizadas em Novembro de 2009 e em Maio de 2010, que corresponde ao período de seca e chuva na região (Ver Apêndice D). Foram escolhidos três pontos amostrais de acordo com a figura 9. O ponto 1 ( $6^{\circ} 33' 7.62''\text{S}/ 93^{\circ} 23' 515''\text{W}$ ) corresponde ao local onde a CAERN faz a captação da água para o tratamento e o ponto 2 ( $6^{\circ} 31' 4.48''\text{S}/ 93^{\circ} 23' 8.46''\text{W}$ ) encontra-se na confluência das drenagens que contribuem para o açude e o Ponto 3 representa a água já tratada e distribuída nas casas do município.

As amostras de água referentes a cada ponto foram coletadas de acordo com Vargas *et al* (2003). Aproximadamente 3 litros de água superficial de cada ponto foram coletadas a 50 cm da superfície e armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$ , em frascos âmbar estéreis, por um período máximo de 15 dias.



**Figura 9.** O açude de Lucrécia e a definição dos pontos de coleta da água. FONTE: Google Earth.

### 3.2.2 Análise química da água

Os níveis de Cádmio, Cobre, Zinco, Chumbo, Cromo, Níquel e Manganês foram determinados pela espectrometria de absorção atômica em chama em colaboração com o Núcleo de Análises de Águas, Alimentos e Efluentes da Fundação de Apoio a Educação e ao Desenvolvimento Tecnológico do Rio Grande do Norte. A quantificação dos metais foi realizada no Espectrofotômetro de absorção atômica (AA-50B). Além disso, alguns parâmetros físico-químicos como, turbidez, total de sólidos em suspensão, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal também foram analisados por essa mesma instituição.

### 3.2.3 Teste do Micronúcleo em *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN)

O TRAD-MCN foi realizado utilizando o protocolo estabelecido por Ma (1981). Os talos com botões jovens da *T. pallida* foram coletados de plantas cultivadas em terra vegetal e adubadas com formulação de N:P:K (10:10:10). As plantas foram mantidas a pleno sol e irrigadas diariamente com água destilada, mantendo as condições ideais.

Para os testes de genotoxicidade, foi utilizada a água bruta (não diluída) de cada ponto coletado (P1, P2 e P3). Esse teste foi realizado para as duas coletas, representando o período seco e o chuvoso. Além disso, foi realizado um controle negativo, com a água destilada, e o controle positivo utilizando o Formaldeído (0,2%).

Na realização do bioensaio, cerca de 30 talos de *Tradescantia pallida* para cada ponto da água do açude, foram coletados e mantidos em laboratório com solução nutritiva de Hoagland, por 24 horas. Em seguida, foram transferidos para beakers contendo a água bruta, respectiva a cada ponto, por 12 horas. Após o período de exposição, os talos foram submetidos a um processo de recuperação por 24 horas com solução de Hoagland (HOAGLAND e ANON, 1950) (Figura 10). Depois, os botões foram fixados em solução de ácido acético e álcool (1:3) por 48 horas e armazenadas em álcool 70%.



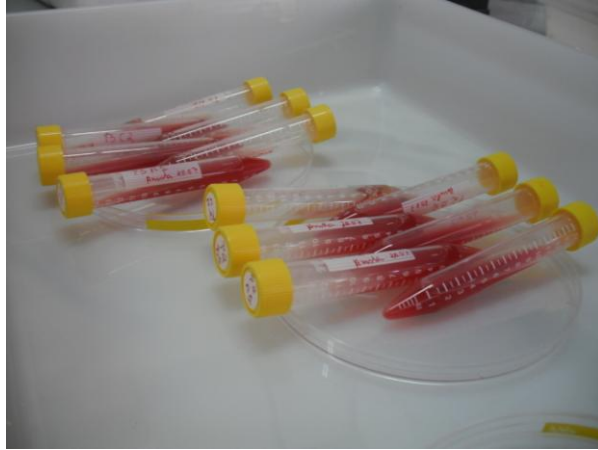
**Figura 10.** Experimento com a *Tradescantia pallida* em hidroponia.

Para a análise, os botões foram dissecados e as anteras maceradas sobre a lâmina, junto com uma gota do corante Carmin a 2%. Somente as lâminas contendo a fase em tetrade foram consideradas. Foram analisadas 300 tétrades por lâmina em aumento de 400x, contando-se o número de tétrades normais e de tétrades com a presença de um ou mais micronúcleos. Para a identificação e contagem dos micronúcleos, os critérios foram: a) MN com perímetro bem delimitado, sugerindo a presença de membrana; b) coloração e textura do MN semelhante a do núcleo da célula analisada; c) localização do MN no mesmo plano focal do núcleo; d) ausência de sobreposição (CABRAL, 2010). A frequência de micronúcleo foi expressa em porcentagem (número total de MN em 100 tétrades).

### **3.2.4 Teste do Micronúcleo em Linfócitos Humanos (CBMN)**

O sangue periférico foi obtido de 3 doadores homens saudáveis (idades de 20, 21 e 23 anos). Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRN. Para cada doador, foi feita uma cultura de células em duplicata para cada ponto amostrado do açude. Para cada preparação da cultura, foi seguido o protocolo de Huang *et al.* (2009), no qual 0.3 ml de sangue heparinizado, foi adicionado a 4.7 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma), contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de Penicilina e Estreptomicina e 100 ul de Fitoemaglutinina (Gibco). Vinte e quatro horas após a preparação desse meio, as culturas foram suplementadas com 200 µl das amostras de água, que foram previamente esterilizadas em um filtro Sartorius com uma membrana de poro de 0,22 mm. Com o intuito de verificar a dose-resposta para indução de micronúcleos, foram realizados 3 testes para cada ponto, utilizando a água Bruta (100%) e a água diluída a 50% e a 25%. Para o controle negativo foi utilizado a água destilada e para o controle positivo a Mitomicina C (0,1 µg/ml).

Quarenta e quatro horas após a estimulação com Fitoemaglutinina, foi adicionado 4.5 µg/mL de Citocalasina B. A cultura de células foi incubada por um tempo total de 72h a 37 °C (Figura 11). Decorridas essas 72 horas do momento da semeadura, deu-se início à colheita dos linfócitos com tratamento de solução hipotônica (KCL 0,075M) para lisar as células vermelhas. Após isso foram realizadas 3 lavagens com solução fixadora Metanol/Ácido Acético (3:1). Em seguida, as lâminas foram preparadas instilando-se 70 µl do material em lâmina previamente lavada. Para cada cultura foram preparadas 4 lâminas. A coloração das lâminas foi feita com solução de Giemsa diluído em tampão fosfato (pH 6,8), na proporção de 1:40, por sete minutos, e a análise realizada em microscópio óptico comum em objetiva de 40x.



**Figura 11.** Cultura de sangue periférico após o tempo total de incubação.

Para cada ponto amostral, foram analisadas 3000 células binucleadas, de acordo com os critérios propostos por Fenech *et al* (2003).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI R.J.; ANDERSON D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, 463: 111–172, 2000.

ALVES, N. O. **Genotoxicidade e Composição do Material Particulado Emitido pela Queima de Biomassa: Um Estudo de Caso em Tangará da Serra, Região da Amazônia Brasileira**. 2010. 76 páginas. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

AMARAL, V. S. **Toxicidade Genética Associada a Região Hidrográfica do Guaíba Através de Bioensaios de Curta Duração**. 2005. 123 páginas. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ANUPAMA, M.; MURGAN, S. S.; BALAKRISHNA MURTHY, P. Broccoli flower head extract reduces mitomycin-C induced sister chromatid exchange in cultured human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 3351–3353, 2008.

BAPTISTA, G. M. M.; CARVALHO, J. M., CAMACHO, R. G. V., RIBEIRO, R. J. S.; BIAS E. S., ZARA, L. F. **Comportamento sazonal da vegetação da Caatinga na região de Lucrécia, RN, em 2003 e 2004, por meio dos dados sensor CCD do CBERS-2**. Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil, , INPE, p. 797-804, 2005.

BARBOSA, J. S; CABRAL, T. M ; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73: 320–325, 2010.

BATALHA, J.R.F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; DEUR, T.; CARVALHO, H.A.; ALVES, E.S.; DOMINGOS, M.; RODRIGUES, G.S.; SALDIVA, P.H.N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay. **Mutation Research**, 426: 229-232, 1999.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. **Biochimie**, 88, 1549-1559, 2006.

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

BOETTCHER, M.; GRUND, S.; KEITER, S.; KOSMEHL, T.; REIFFERSCHIED, G.; SEITZ, N.; ROCHA, P.S.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research** 700: 11–17, 2010.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LYN, Y.; CHANG W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleus Project. **Mutation Research**, 543: 155-166, 2003.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. S. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, 28:625–631, 2007.

BORTOLI, G.M.; AZEVEDO, M.B.; SILVA, L.B. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutation Research** 675: 1–4, 2009.

CABRAL, T. M. **Avaliação dos Constituintes e do Potencial Mutagênico do Material Particulado Oriundo do Beneficiamento Artesanal da Castanha de Caju**. 2010. 108 páginas. Tese (Doutorado em Ciências – Patologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CAMPOS, T. F. C.; MARCON, A. E.; PETTA, R. A.; PASTURA, V. F. S.; GUEDES, A. G. **Distribuição da Radiação Gama e “Radônio Interior” na cidade de Lucrécia (RN, Brasil): Radioatividade natural e o risco de malignidades**. X Congresso de Geoquímica dos Países de Língua Portuguesa E XVI Semana De Geoquímica, 28 de Março a 01 de Abril. Porto- Portugal, Resumo Expandido, 2010.

CARMINITTI, L. **Estabelecimento do potencial de plantas no monitoramento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes na atmosfera urbana de São Paulo, SP**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo- SP, 2008.

CARVALHO-OLIVEIRA, R.; POZO, R.M.K.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; MARTINS-JUNIOR, H.A.; BUSTILHO, J.O.W.V.; SAIKI, M.; SATO, I.M.; SALDIVA, P.H.N. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. **Environmental Research**, 98: 1-7, 2005.

CHATTOPADHYAY, I.; SINGH, A.; PHUKAN, R.; PURKAYASTHA, J.; KATAKIB, A.; MAHANTA, J.; SAXENA, S.; KAPUR, S. Genome-wide analysis of chromosomal alterations in patients with esophageal squamous cell carcinoma exposed to tobacco and betel quid from high-risk area in India. **Mutation Research**, 696 : 130–138, 2010

COSTA, I. A. S.; SANTOS, A. P.; SILVA, A. A.; MELO, S. G.; MENDONÇA, J. M. S.; PANOSSO, R. F.; ARAUJO, M. F. F. Florações de Algas Nocivas: Ameaça as Águas Potiguares. **Revista da FAPERN**, v 1, n° 4, 2006.

CROSSGROVE, J.; ZHENG, W. Manganese toxicity upon overexposure. **NMR in Biomedicine**, 17: 544–553, 2004.

DE WOLF, H.; BLUST, R.; BACKELJAU, T. The use of RAPD in ecotoxicology. **Mutation Research**, 566: 249-262, 2004.

DIAS, C. C. **Os caminhos do Rio Parnaíba: uma abordagem sobre os problemas ambientais na bacia, a navegabilidade, a capacidade de carga e a batimetria**. Teresina: Alínea Publicações, 2004.

DIAS, M. F. **Ação interdisciplinar em caso prático de gestão ambiental na região oeste do Estado do Rio Grande do Norte**. 2006. 163 págs. Dissertação (Mestrado em Planejamento e Gestão Ambiental). Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2006.

DIEGUES, A. C. **O mito moderno da natureza intocada**. Editora Hucitec. 3 edição. São Paulo – SP, 2001.

DUAN, C-Q.; HU, B.; WANG, Z-H.; WEN, C-H.; YAN, S-Q.; JIANG, X-H.; WANG, D-K.; LI, Q.; LIANG, X-F. Tradescantia bioassays for the determination of genotoxicity of water in the Panlong River, Kunming, People's Republic of China. **Mutation Research**, 426: 127-131, 1999.

ELALI, G. A. o ambiente da escola – o ambiente na escola: uma discussão sobre a relação escola–natureza em educação infantil. **Estudos de psicologia**: 8: 309-319, 2003.

EL ASSLOUJ, J.; AMAHDAR, L.; GLOUIB, K.; KHOLTEI, S.; EL AMRANI PAAZA, N.; VERSCHAEVE, L.; HILALI, A. *In vitro* genotoxicity of wastewaters from the town of Settat, Morocco. **Arh Hig Rada Toksikol**, 60:289-296, 2009.

EL-SHAHAWI, M. S.; HAMZA, A.; BASHAMMAKH, A. S.; AL-SAGGAF, W. T. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta*, 80: 1587–1597, 2010.

EL-ZEIN, R.A.; SCHABATH, M. B.; ETZEL, C. J.; LOPEZ, M. S.; FRANKLIN, J. D.; SPITZ, M. R. Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay as a Novel Biomarker for Lung Cancer Risk. **Cancer Research**, 2006.

ENNACEUR, S.; RIDHA, D.; MARCOS, R. Genotoxicity of the organochlorine pesticides 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and hexachlorobenzene (HCB) in cultured human lymphocytes. **Chemosphere** 71: 1335–1339, 2008.

ERICKSON, E.P. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: An update. **Mutation Research** 705: 96–106, 2010.

FAGGIONATO, S. **Percepção ambiental**. Disponível em: [www.educar.sc.usp.br/textos](http://www.educar.sc.usp.br/textos). Acessado em 21/ 04/ 2009.

FALCK, G. M.; HIRVONEN, A.; SCARPATO, R.; SAARIKOSKI, S. T.; MIGLIORI, L.; NORPPA, H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutation Research**, 441: 225-237, 1999.

FAURE, G. **Principes and Application of Inorganic Geochemistry**. New York: MacMillan Publishing Cia., 626p, 1991.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61: 759-767, 1990.

FERREIRA, M.I.; RODRIGUES, G.S.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P.H.N. In situ monitoring of mutagenicity of air pollutants in São Paulo city using Tradescantia – SHM bioassay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n.2, p.253- 258, 2003.

FENECH, M. Advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, 392: 11-18, 1997.

FENECH, M. Cytokinesis block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455: 81-95, 2000.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, E.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, 534: 65–75, 2003.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis** 14: 605-612, 1999.

FENECH, M; FERGUSON, L. R. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. **Mutation Research**, 475:1-6, 2001.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, 147: 29-36, 1985.

FENECH, M.; RINALDI, J. A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and nonvegetarians. **Carcinogenesis** 16: 223-230, 1995.

FERNADES, M.B.; SICRE, M. A.; BOIREAU, A. ; TRONCZINSKY, J. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine river and its estuary. **Marine Pollution Bulletin**, 34: 857-867, 1997.

GANNA, J. M.; ORDONEZ, R.; ZAMPINI, C.; HIDALGO, M.; MEONI, S.; ISLÁ, M. I. Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. *Journal of Hazardous Materials* 155: 403–406, 2008.

GAUTHIER, J. M.; DUBEAU, H.; RASSART, E.; JARMAN, W. M.; WELLS, R. S. Biomarkers of DNA damage in marine mammals. **Mutation Research**, 444: 427-439, 1999.

GELLER, M.; ZENICK, A. Aging and the environment: A research framework. **Environmental Health Perspectives**, 113(9): 1257-62, 2005

GIAGINIS, C.; GATZIDOU, E; THEOCHARIS, S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. **Toxicology and applied pharmacology** 213, 282-290, 2006.

GOYER, R. A.; LIU, J.; WAALKES, M. P. Cadmium and cancer of prostate and testis. **Biometals** 17, 555–558, 2004.

GRANT, W.F., The present status of higher plant bioassay for the detection of environmental. **Mutation Research**, 310: 175-185, 1994.

GUIMARÃES, E.T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CALDINI JR, N.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; SALDIVA, P.H.N. Detection of the genotoxicity of air pollutants

- in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) assay. **Environmental and Experimental Botany**, 2000.
- HAMZA, V. H; MOHANKUMAR, M. N. Cytogenetic damage in human blood lymphocytes exposed *in vitro* to radon. **Mutation Research**, 661: 1–9, 2009.
- HARTWIG, A. Current aspects in metal genotoxicity. **BioMetals** 8: 3-11, 1995.
- HEDDLE, J.A. A rapid *in vitro* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, 18:1987-1990, 1983.
- HUANG, P.; HUANG, B.; WENG, H.; NAKAYAMA, K.; MORIMOTO, K. Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. **Preventive Medicine** 48: 383–388, 2009.
- IDEMA**. Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte. Governo do Estado do Rio Grande do Norte. Disponível em: [www.idema.rn.gov.br/](http://www.idema.rn.gov.br/) Acesso em 03 de julho de 2009.
- Instituto Nacional do Câncer – INCA**, 2007. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. < <http://www.inca.gov.br/> >. Acesso em 05 de Julho de 2009.
- JOLIBOIS, B.; GUERBET, M. Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the *Salmonella* fluctuation test and the SOS chromotest. **Mutation Research**, 565: 151–162, 2005.
- JOSEPHY, P. D.; MANNERVIK, B.; MONTELLANO, P. O. **Molecular Toxicology**. Oxford University Press, New York, 368p, 1997.
- KADMIRI, M.; GLOUIB, K.; VERSCHAEVE, L.; HILALI, A. Cytogenetic monitoring of domestic mammals exposed to wastewaters from the localities of Dladla and Boukallou near Settat, Morocco. **Environment International**, 32:690–696, 2006.
- KASPRZAK, K. S.; BAL, W.; PORTER, K.; BIALKOWSKI. Studies on oxidative mechanisms of metal-induced carcinogenesis. In: Dizdaroglu M, Karahaya AE (eds) **Advances in DNA Damage and Repair**. Kulver Academic Publishers, New York, pp.93-208, 1999.
- KASPRZAK, K.S., SUNDERMAN, F.W., JR. & SALNIKOW, K. Nickel carcinogenesis. **Mutation Research** 533, 67-97, 2003.
- KNASMULLER, S.; UHL, M.; GOTTMANN, C. H.; MAJER, B. J. The *Tradescantia* micronucleus bioassay. In: MALUSZYNSKA, J; PLEWA, M. (editores). **Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health**. Katowice: Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, 149 páginas, 2004.
- KRISHNAJA, A. P.; SHARMA, N. K. Variability in cytogenetic adaptive response of cultured human lymphocytes to mitomycin C, bleomycin, quinacrine dihydrochloride, Co<sup>60</sup> g-rays and hyperthermia. **Mutagenesis**, 23: 77–86, 2008
- KIRSCH-VOLDERS, M. The CB *in vitro* Micronucleus Assay in Human Lymphocytes. Special Issue, **Mutation Research**, 392: Special Issue (1-2), 1997.

- LEME, D. M. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de águas e de sedimentos do Rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto do vazamento de oleoduto da região.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.
- LEMOS, C. T.; ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. **Mutation Research** 467:1–9, 2000.
- LEMOS, C. T., TERRA, N. R. **Poluição: Causas, efeitos e controle.** *Genética Toxicológica*. p.119-137, 2003.
- LU, H., SHI, X., COSTA, M., HUANG, C. Carcinogenic effect of nickel compounds. *Mol. Cell. Biochem.* 279, 45–67, 2005.
- LUTZE, L.H.; WINEGA, R.A; JOSTES, R.; CROSS, F.T.; CLEAVER, J.E.. Radon-induced deletions in human cells: role of nonhomologous strand rejoining. **Cancer Research**, 52:5126–5129, 1992.
- MA, T. H.; GRANT, W. F. The Tradescantias – adventurous plants. **The Herbarist**. V.48. p. 36-44, 1982.
- MALANCA, A., REPETTI, M.M., MACEDO, H.R. Gross Alpha- and Beta-Activities in surface and groundwater of Rio Grande do Norte, Brazil. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 49, n° 7, 893-898, 1997.
- MARCZWSKY, M. **Avaliação da percepção ambiental em uma população de estudantes do ensino fundamental de uma escola municipal rural: Um estudo de caso.** 2003, 186 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- MAJER, B. J.; KAKY, B.; KNASMULLER, S.; KASSIE F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring for individual at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research**, 489: 147-172, 2001.
- MAJER, B. J.; TSCHERKO, D.; PASCHKE, A.; WENNRICH, R.; KUNDI, M. KANDELER, E.; KNASMÜLLER, S. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. **Mutation Research**, 515: 111–124, 2002
- MANAHAN, S .E. **Environmental Science and Technology.** Lewis Publishers, New York, 1997.
- MARCON, A. E.; FERREIRA, D. M.; MOURA, M. F. V.; CAMPOS, T. F.C.; AMARAL, V. S.; AGNEZ-LIMA, L. F.; DE MEDEIROS, S. R. B. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. **Chemosphere**, 2010 in press.
- MARCON, A. E.; GUEDES, A.; CAMPOS, T. F. C., AGNEZ-LIMA, L. F.; DE MEDEIROS, S. R. B **Avaliação de metais e radioatividade alfa e beta total nas águas do açude de Lucrecia, localizado na região oeste do Rio Grande do Norte, Brasil.** X Congresso de Geoquímica dos Países de Língua Portuguesa E XVI Semana De Geoquímica, 28 de Março a 01 de Abril. Porto- Portugal, Resumo Expandido, 2010.

- MARCON, E.A.; MOREIRA, D. A.; AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R.B. **Genotoxicidade do extrato orgânico (XAD-4) das águas do Açude de Lucrecia em células CHO-9 com o teste cometa**. 2008. Disponível em: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs/25797.pdf>. Acesso em 05 de Março de 2009.
- MARQUES, A. L.; GERALDO, L. P.; SANTOS, W. Níveis De Radioatividade Natural Decorrente Do Radônio No Complexo Rochoso Da Serra De São Vicente, SP. **Radiol Bras.**, 39 (3): 215–218, 2006.
- MARIANI, R.L.; JORGE, M.P.M.; PEREIRA, S.S.; MELIONE, L.P.; CARVALHO-OLIVEIRA, R.; MA, T.H.; SALDIVA, P.H.N. Association between micronuclei frequency in pollen mother cells of *Tradescantia* and mortality due to cancer and cardiovascular diseases: A preliminary study in Santo José dos Campos, Brazil. **Environmental Pollution**, 157: 1767-1770, 2009
- MARIN, A. A., TORRES, O. H. & COMAR, V. A educação ambiental num contexto de complexidade do campo teórico da percepção. **Interciência**, 28 : 616-619, 2003.
- MAROTI, P. S., SANTOS, J. E. & PIRES, J. S. R. Percepção ambiental de uma Unidade de Conservação por docentes do ensino fundamental. **In: SANTOS, J. E. & PIRES, J. S. R. (eds.) Estação Ecológica de Jataí**. Volume I, São Carlos: Rima. p.207-217, 2000.
- MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDER, I.; KISCH-VOLDERS, M. Chromosomal Changes: induction, detection methods and aplicability in human biomonitoring. **Biochimie** 88: 1515-1531.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M. I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology** 29: 148-158, 2006.
- MIELLI, A. C; MATTA, M. E. M.; NERSESYANC, A.; SALDIVA, P. H. N.; UMBUZEIRO, G. A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, 672: 51-54, 2008.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea estado do rio grande do norte – diagnóstico do município de Lucrecia**, 2005.
- MONTERO, R; SERRANO, L.; ARAUJO, A.; DAVILA, V.; PONCE, J.; CAMACHO, R.; MORALES, E., MENSEDEZ, A. Increased cytogenetic in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis** 21(5): 335-342, 2006.
- MÜLLER, P.; STOCK, T.; BAUER, S.; WOLFF, I. Genotoxicological characterization of complex mixtures. Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. **Mutation Research**. 515: 99-109, 2002.
- NORPPA, H. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. **Environ. Health Perspect.** 106: 829-835, 1997.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, 567: 109–149, 2004.

PRAJAPATI, S.K.; TRIPATHI, B.D. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. **Environmental International**, 2008.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B e A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxicos (Fazenda Canguiri-UFPR)**. 126p. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Paraná, 2007.

REID, T. M.; FEIG, D.I.; LOEB, L. A. Mutagenesis by metal-induced oxygen radicals. **Environ. Health Perspect.**, 102: 57-61, 1994.

RUIZ, E.F.; RABAGO, V.M.E.; LECONA, S.U.; PEREZ, A.B.; MA, T.H. *Tradescantia*-micronucleus\_Trad-MCN.bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring, **Mutation Research**, 270: 45- 51,1992.

SANTOS, J. E, JESUS, T. P., HENKE-OLIVEIRA, C. & BALLESTER, M. V. R. Caracterização perceptiva da Estação Ecológica de Jataí (Luiz Antônio, SP) por diferentes grupos sócio-culturais de interação. **In: SANTOS, J. E. & PIRES, J. S. R. (eds.) Estação Ecológica de Jataí**. Volume I, São Carlos: Rima. p.163-206, 2000.

**SEMARH**. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Governo do estado do Rio Grande do Norte. Disponível em: <http://www.semarh.rn.gov.br/> Acesso em: 15 de Maio de 2009.

SERRA, C. V. **Abordagem humana integrada a estudos de uma problemática ambiental no interior do Rio Grande do Norte**. 2006, 119p. Dissertação (Mestrado em Planejamento e Gestão Ambiental). Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2006.

SERRA, C. V.; CASTRO, S. S. L.; BAPTISTA, G. M. M.; CASTRO, C. F. S.; ZARA, L. F. **Elementos traço no ambiente associados ao risco de câncer**. 2006. Disponível em: < <http://www.cprm.gov.br/publique/media/Painel31.pdf> >. Acessado em 10 de novembro de 2008.

SILVA, T. S. **Usos e Percepções de comunidades do entorno de uma unidade de conservação do Semiárido nordestino: instrumento para gestão?** Natal, 2009. 64 páginas. Dissertação (Programa Regional de Pós Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

STEINKELLNER, H.; KASSIE, F.; KNASMULLER, S. *Tradescantia*-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. **Mutation research**, 426: 113–116, 1999

SUMMAK, S.; AYDEMIR, N.C.; VATAN, O; YILMAZ, D.; ZORLU,T.; BILALOGLU, R. Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology** 48: 2443–2447, 2010.

- SUYAMA, F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A.; SALDIVA, P.H.N. Pollen mother cells of *Tradescantia* Clone #4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-ray. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 35: 127–129, 2002.
- SWEETMAN, A. J.; VALLE, M. D.; PREVEDOUROS, K.; JONES, K. C. The role of soil organic carbon in the global cycling of persistent organic pollutants (POPs): interpreting and modelling field data. **Chemosphere** 60: 959–972, 2005..
- TUBIANA, M. **Health and environment**. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 323(7):651-64, 2000.
- TUNDISI, J. G. Recursos Hídricos. **MultiCiência**, 2003.
- UEDA, J.; TAKAI, M.; SHIMAZU, Y.; OZAWA Reactive oxygen species generated from the reaction of copper (II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission. **Arch. Biochem. Biophys.** 356:231-239, 1998.
- UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A. **Genotoxicidade ambiental**. Ecotox. Aquát., Cap. 14, p. 327 – 328, 2006.
- YANG, G. *Tradescantia*-micronucleus assay on the water quality of lake Hongzhe in Jiangsu Province, China. **Mutation Research**, 426:155–157, 1999.
- VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact** 160, 1-40, 2006.
- VARGAS, V. M. F.; MIGLIAVACCA, S. B.; MELO, A.C.; HORN, R. C.; GUIDOBONO, R. R.; SÁ FERREIRA, I. C. F.; PESTANA, M. H. D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Mutation Research**, 490: 141-158, 2001.
- VILLALOBOS-PIETRINI, R.; FLORES-MÁRQUEZ, A. R.; MENESES, M. A.; TAVERA, L.; BALCÁZAR, M.; LÓPEZ, L.; GÓMEZ-ARROYO, S. Genetic effects observed in tetrads of *Tradescantia* induced by radon. **Mutation Research**, 426: 215–219, 1999.
- VIOLANTE, A. C. **Moradores e turistas no município de Porto Rico, PR: Percepção ambiental no contexto de mudanças ecológicas**. 2006, 126p. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- YANG, G. *Tradescantia*-micronucleus assay on the water quality of lake Hongzhe in Jiangsu Province, China. **Mutation Research** 426:155–157, 1999
- YU, M.H. **Environmental Toxicology**. Lewis Publishers, Boca Ratón, 255p, 2001.
- WHYTE, A.V.T. **Perception de l'environnement: lignes directrices methodologiques pour les etudes sur le terrain**. Paris: UNESCO, 1978, 134p.
- ZENG, D.; LI, Y.; LIN, Q. Pollution monitoring of three rivers passing trough Fuzhou City, People's Republic of China. **Mutation Research**, 426: 159-161, 1999.

## **CAPÍTULO I**

### **Percepção Ambiental no Sertão do Estado do Rio Grande do Norte: Um Estudo de Caso**

ESTE ARTIGO FOI SUBMETIDO À REVISTA EDUCAÇÃO AMBIENTAL EM AÇÃO E, PORTANTO, ESTÁ FORMATADO DE ACORDO COM AS RECOMENDAÇÕES DESTA REVISTA (ANEXO A). NO ANEXO B CONSTA O COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MESMO.

## **Percepção Ambiental no Sertão do Estado do Rio Grande do Norte: Um estudo de caso**

Anuska Conde Fagundes Soares Garcia<sup>1</sup>, Viviane Souza do Amaral<sup>2</sup> e Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, anuska\_garcia@hotmail.com

<sup>2</sup> Doutora em Genética, Professora Adjunta do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Campus Universitário, Lagoa Nova – Natal/RN. CEP 59.072-970, (84) 3211-9209, vamaral@ufrnet.br

<sup>3</sup> Doutora em Genética, Professora Titular do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Campus Universitário, Lagoa Nova – Natal/RN. CEP 59.072-970, (84) 3211-9209, sbatistu@cb.ufrn.br

**RESUMO:** Diante da realidade encontrada no sertão nordestino, onde a quantidade de chuvas durante o ano é geralmente insuficiente, a população convive em um meio ambiente singular. Visto que o ambiente é fundamental para a formação da cultura e do tipo de vida do grupo humano que nele se instala, esse trabalho teve como objetivo averiguar a percepção ambiental dos moradores do município de Lucrécia, o qual detém um dos maiores açudes da região. Foram aplicados 100 questionários em Maio de 2010. A análise dos dados permitiu observar os conhecimentos sobre meio ambiente que os moradores possuem, assim como, a forte ligação e as concepções que os mesmos possuem com o açude do município. Dessa forma, espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam servir como um diagnóstico do saber/agir ambiental da população local e se torne base para a elaboração de atividades de educação ambiental na região semi-árida do Estado do Rio Grande do Norte.

**Palavras-Chaves:** Recursos hídricos, Educação Ambiental, Lucrécia.

### **1. INTRODUÇÃO**

O sertão nordestino é a sub-região que apresenta os menores índices pluviométricos de todo o país, apresentando irregularidade de chuvas, clima seco e elevada evapotranspiração, características que levam sua população a enfrentar longos períodos de estiagem. Nesse cenário, a escassez de água constitui um forte entrave ao desenvolvimento sócio econômico e, até mesmo, à subsistência da população. Visando minimizar os problemas acarretados pela seca, a construção de grandes açudes pelo poder público se tornou uma das mais importantes iniciativas para garantir água para a população, além de ser uma oportunidade de promover o desenvolvimento da região, em virtude da sua múltipla funcionalidade (PETROVICH & ARAÚJO, 2009). De acordo com Tundisi *et al.* (2009), esses reservatórios foram construídos para diversas finalidades, tais como: recreação, irrigação, produção de energia elétrica, abastecimento das populações e produção pesqueira. Entretanto, mesmo com toda a importância que os açudes representam para essas regiões onde a água é um recurso extremamente limitante, os mesmos, são constantemente ameaçados pelas ações indevidas do homem, tais como deposição de lixo, efluentes domésticos não tratados e descarte de resíduos de agrotóxicos,

acentuando assim a perda da qualidade da água, o que acaba resultando em prejuízo para a própria humanidade.

Segundo Leme (2007), dentre os ambientes afetados pela poluição, um dos mais preocupantes é o aquático, devido à água ser um bem mineral essencial as funções vitais dos organismos e, conseqüentemente, a manutenção da vida no planeta. Dessa forma, a sobrevivência das populações pode ser seriamente comprometida em função do volume e da composição dos dejetos lançados, já que estes contêm substâncias tóxicas com potencial de acumulação na cadeia alimentar.

Visto isso, o desenvolvimento de alternativas tecnológicas e educacionais que sensibilizem e conscientizem a população a respeito dos problemas relacionados ao meio ambiente e, em especial, a água, são de fundamental importância para garantir que esse recurso tão precioso seja melhor utilizado, podendo garantir água de qualidade para a nossa geração e para as futuras.

De acordo com Serra (2006), o ambiente é fundamental para a formação da cultura e do tipo de vida do grupo humano que nele se instala, é a base física da sociedade formada. Dessa forma, a percepção ambiental pode ser utilizada como instrumento para se identificar como acontece a relação entre o homem e a natureza, bem como, compreender o grau de conscientização do mesmo quanto à problemática ambiental (MACEDO, 2005). Sabe-se que esse laço entre homem e natureza é complexo e agrega não só os conceitos que o ser humano tem sobre o meio ambiente, mas os outros inúmeros aspectos inerentes à sua natureza, desde os mais rudimentares (instintivos) até os associados à sua complexa evolução biológica e cultural (linguagem, afetividade, imaginação, intuição, arranjo social, etc.) (MARIN *et al.*, 2003). Ainda segundo esta última autora, a interação do ser humano com o ambiente, solidificada em bases tão complexas, tem representado um estímulo para pesquisas de percepção ambiental. Essa percepção tem sido estudada, na maioria dos casos, mediante o levantamento de conceitos de meio ambiente e dos referentes a fenômenos e problemas ambientais.

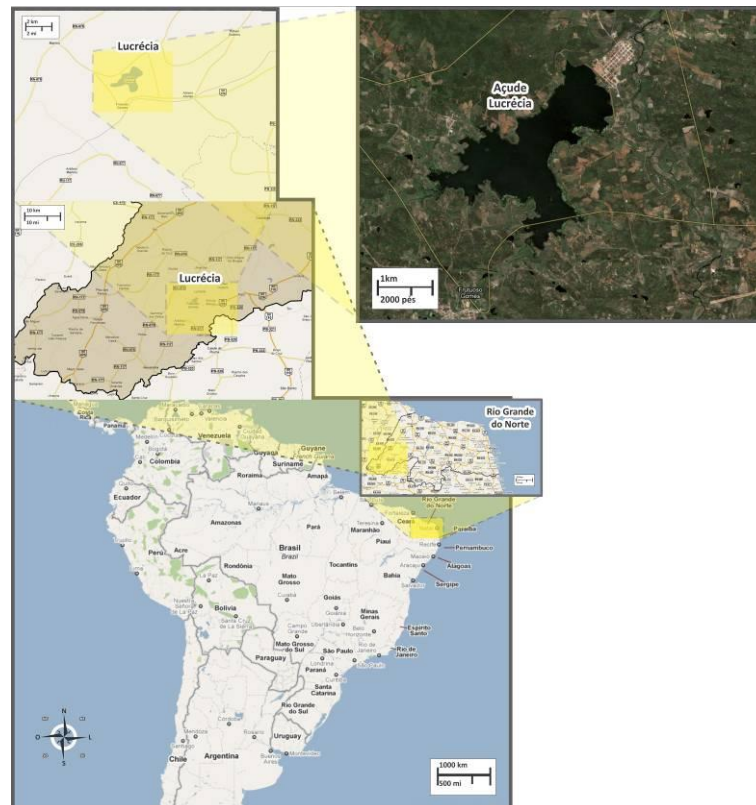
Dessa forma, saber como os indivíduos percebem o ambiente em que vivem, suas fontes de satisfação e insatisfação e suas inter-relações com o local no qual estão inseridos é de fundamental importância, pois só assim, conhecendo a cada um, será possível a realização de um trabalho com bases locais, partindo da realidade do público alvo (FAGGIONATO, 2002).

Diante da necessidade de se entender como determinadas comunidades compreendem e agem diante da sua relação com o meio ambiente em que vivem, este trabalho tem como objetivo principal investigar como os moradores do município de Lucrécia/RN percebem o ambiente em que vivem, seus conhecimentos básicos sobre o meio ambiente e suas fontes de informação, além de como os mesmos utilizam o aqúde da sua cidade e qual a importância desse aqúde para eles.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 – Caracterização da área de estudo**

O município de Lucrécia situa-se na mesorregião Oeste do Estado do Rio Grande do Norte (Figura 1), limitando-se com os municípios de Umarizal, Martins, Frutuoso Gomes e Almino Afonso, abrangendo uma área de 27 km<sup>2</sup>. Segundo a última contagem populacional feita pelo IBGE em 2009, o município apresenta uma população estimada de 3.550 habitantes.



**Figura 1.** A localização do município de Lucrécia (Rio Grande do Norte) e o seu açude.

A 500 m ao Sul do município de Lucrécia, fazendo parte da bacia hidrográfica Apodi-Mossoró, encontra-se o açude público que recebe o nome do município (Açude de Lucrécia) (Figura 1), que possui área de 528,27 ha, correspondendo a uma bacia hidráulica de capacidade máxima em armazenamento de 27.270.000,00 m<sup>3</sup>. Foi construído em 1934 com a finalidade de suprir as necessidades de abastecimento humano e irrigação da região. As cidades de Lucrécia, Frutuoso Gomes e Martins são abastecidas por ele.

Apesar da sua grande importância para o desenvolvimento da região e dos múltiplos usos ao qual é destinado, este açude vem apresentando alguns problemas que podem colocar em risco a população que consome essa água. Entre esses problemas estão: a presença de metais pesados acima do máximo permitido pela legislação brasileira, entre eles o Cobre, Cromo, Zinco, Cádmiio, Manganês e o Níquel; a floração de cianobactérias tóxicas, como *Aphanocarpa sp.*, *Microcystis aeruginosa* e *Cylindropermopsis raciborskii* e a ocorrência natural do Radônio, pela própria formação geológica do local, o qual é considerado a fonte mais importante de exposição humana a radiação (MARCON *et al.*, 2010). Esses poluentes em conjunto, podem comprometer todo o ecossistema, incluindo o homem.

Agravando ainda mais a situação, o dado mais preocupante e que merece destaque, é que os municípios que se utilizam desse açude (Frutuoso Gomes, Martins e Lucrécia) apresentam um histórico de elevada incidência de câncer associado popularmente ao consumo da água do açude de Lucrécia. Esta região apresenta prevalência de câncer cerca de três vezes maior, quando comparada a todo o Estado do Rio Grande do Norte. Entre a maior incidência, está o câncer na via digestiva (BAPTISTA *et al.*, 2005; INCA, 2007; SERRA, 2006).

## 2.2 – Procedimento Metodológico

O instrumento utilizado para a coleta de dados foi um questionário previamente elaborado com questões fechadas e duas questões abertas. Embora tendo a desvantagem de poder influenciar o participante em suas múltiplas alternativas, como adverte Mattar (1994), optou-se por esse tipo de questionário pela facilidade e rapidez na aplicação, além de ser ter uma leitura mais padronizada das respostas.

O protocolo para essa pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CAAE 0004.0.051.000-10). Foram pré-definidos os participantes da comunidade dentre aqueles com idade igual ou superior a 18 anos, que habitem o município, de ambos os sexos, de qualquer etnia, grupo ou classe social. A escolha desses indivíduos foi feita de forma aleatória. Um total de 100 questionários foi aplicado no período entre 17 a 21 de Maio de 2010. Todos os participantes foram voluntários e foi-lhes dado um termo de Consentimento Livre e Esclarecido sobre a pesquisa.

A elaboração do questionário se deu através de levantamento bibliográfico sobre o assunto e baseou-se em pesquisas sobre percepção ambiental já realizadas (BEZERRA *et al.*, 2008; DORNELLES, 2006; LERMEN, 2008; MARCZWSKI, 2006; REMPEL *et al.*, 2008; SIQUEIRA, 2008; TUAN, 1980), tendo sido feitas algumas adaptações, visando o direcionamento e o foco de interesse da pesquisa em questão.

A estrutura do mesmo foi montada de forma a contemplar informações em três enfoques: I. Perfil dos participantes; II. Questões relativas ao conhecimento sobre meio ambiente; III. Questões relativas ao açude de Lucrecia.

A partir dos dados obtidos, foram realizadas análises quantitativas e qualitativas dos dados. Para esta análise quantitativa foi utilizada a análise simples (porcentagens), por meio do software Excel para a tabulação dos dados. Já para análise qualitativa, os dados foram analisados e expressos em categorias de acordo com as respostas dadas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1- Perfis etário, escolar e tempo de residência dos indivíduos

Dentre os 100 questionários aplicados, observou-se um equilíbrio entre os indivíduos de sexo feminino, que representou 52% do universo, e os do sexo masculino, 48%.

Com relação a idade dos entrevistados foram pré-definidas categorias de faixas de idade que compreendiam desde os 18 anos até acima de 60. A faixa entre 18 a 20 anos foi representada por 17% dos participantes, seguida pela faixa entre 21 a 30 anos com 39% do total. Entre 31 a 40 anos estavam 15% dos indivíduos, 16% entre 41 a 50 anos, 9% entre 51 a 60 anos e 4% tinham idade acima dos 60 anos.

No que diz respeito ao tempo de moradia no local, 87% dos entrevistados afirmaram morar na cidade há mais de 10 anos. Isso é um dado que demonstra a forte ligação que os moradores possuem com o município.

Os dados sobre escolaridade dos participantes mostraram que 25% possuem o 1º grau incompleto, 26% o 1º grau completo, 23% possuem 2º grau incompleto, 19% possuem o 2º grau completo. Com relação ao ensino superior, 2% afirmaram tê-lo incompleto e 3% completo. Nesta amostra, os participantes que disseram ser analfabetos correspondeu a 2%.

### 3.2- Questões relativas ao conhecimento sobre meio ambiente

Para que futuros projetos em educação ambiental sejam efetivados, é necessário conhecer as concepções de meio ambiente das pessoas envolvidas na atividade. De acordo com Reigota (2001), o meio ambiente é o lugar determinado ou percebido, onde os elementos naturais e sociais estão em relações dinâmicas e em interação. Essas relações implicam processos de criação cultural e tecnológica e processos históricos e sociais de transformação do meio natural e construído. Deste modo, o espaço transformado pelo homem que atende as exigências de habitabilidade é, junto com o meio natural, o ambiente.

Visto isso, procurou-se averiguar entre os moradores o conhecimento deles a respeito dos elementos que fazem parte do meio ambiente. Foi solicitado que assinalassem esses elementos, já definidos no questionário, que eles achassem correspondentes ao ambiente. Na tabela 1 a seguir, encontram-se os resultados.

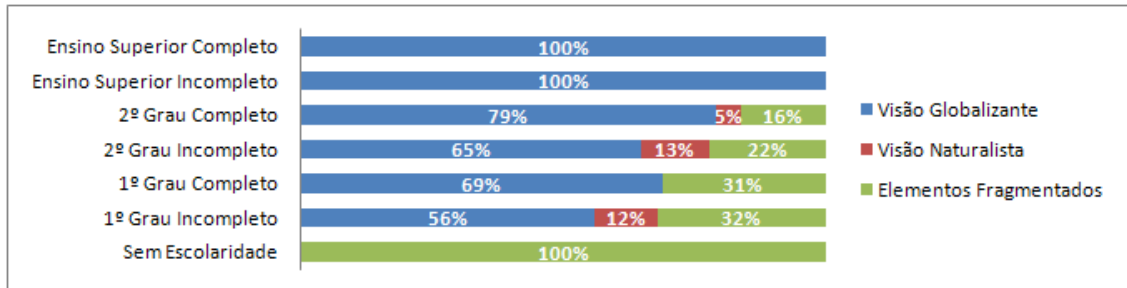
**Tabela 1.** Percentual das respostas para cada um dos elementos (definidos no questionário) que fazem parte do meio ambiente.

<b>Elementos</b>	<b>Total de Respostas (%)</b>
Rios, Lagos e Mares	32
Os animais	30
Árvores, Plantas	32
Ar, Céu	24
Pessoas	18
Praças, Parques, Casas e Prédios	8
Ruas, Calçadas, Estradas	3
Todas as alternativas estão corretas	67

Pôde-se constatar que a grande maioria dos moradores (67%) possui uma visão bastante clara daquilo que faz parte do meio ambiente em si, onde elementos naturais e antrópicos estão interligados. Segundo Reigota (2001), essa é considerada a visão globalizante, onde há uma evidência entre os aspectos sociais e naturais. Entretanto, quando analisados os questionários individualmente, foi observado que 11% dos moradores atribuem ao meio ambiente apenas os elementos naturais, retirando desse contexto os elementos antrópicos e inclusive, o próprio homem. Com base nesse último dado, percebe-se que o conhecimento de alguns participantes sobre meio ambiente está diretamente ligado à natureza como intocável e externa ao homem, ou seja, uma concepção naturalista, para o qual meio ambiente é sinônimo de natureza (SANTOS & MACEDO, 2008). Resultados semelhantes foram descritos por Oliveira *et al* (2007), onde mapas mentais foram feitos com moradores de comunidades rurais do semi-árido paraibano e essa visão naturalista foi exaltada. Segundo Barizan (2003), essas representações naturalistas correspondem a visões fragmentadas do mundo, onde os seres humanos e suas atividades ainda são considerados de forma isolada em relação à natureza, entendida como sendo constituída exclusivamente pelos seres vivos (animais e vegetais) e pelo meio físico-químico natural (rios, lagos, mar e montanhas, sol, etc). Com relação à visão antropocêntrica, onde apenas os elementos antrópicos são evidenciados, esta não foi relatada por nenhum participante.

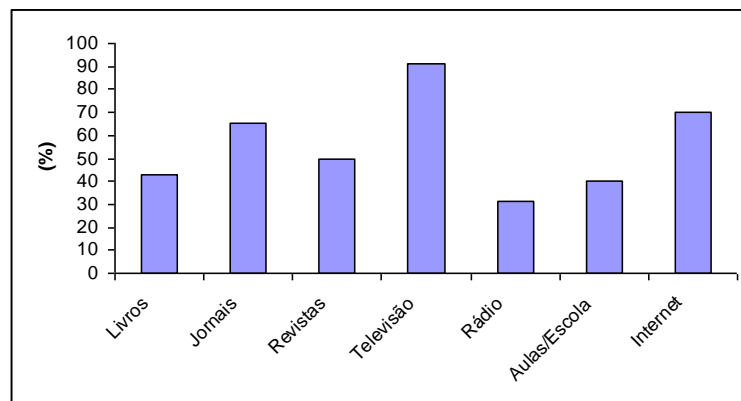
Para explorar um pouco mais essa questão do conhecimento ambiental, realizou-se uma associação dos dados entre a escolaridade e o conhecimento sobre os elementos que constituem o meio ambiente. Baseado nas respostas dadas na questão anterior, para esta análise, os elementos foram agrupados em três grupos que correspondem a visão globalizante, a visão naturalista e elementos

fragmentados (elementos marcados aleatoriamente) (Figura 2). A partir dessa análise, observou-se que com o aumento do nível de escolaridade há também o aumento da visão adequada do que seja meio ambiente (visão globalizante). Os participantes sem escolaridade *versus* participantes com ensino superior, demonstram bem essa oposição de conhecimento. Isso demonstra a importância de uma formação escolar continuada em prol do conhecimento não só ambiental, mas do conhecimento de forma generalizada.



**Figura 2.** Porcentagens dos participantes de acordo com o seu grau de escolaridade e a associação com as visões sobre os elementos que compõem o meio ambiente.

Com o intuito de saber de onde os moradores de Lucrécia obtêm informações a respeito do meio ambiente, lhes foi feita a pergunta de quais meios de comunicação (os quais já estavam no questionário) que eles utilizavam para tal (Figura 3).



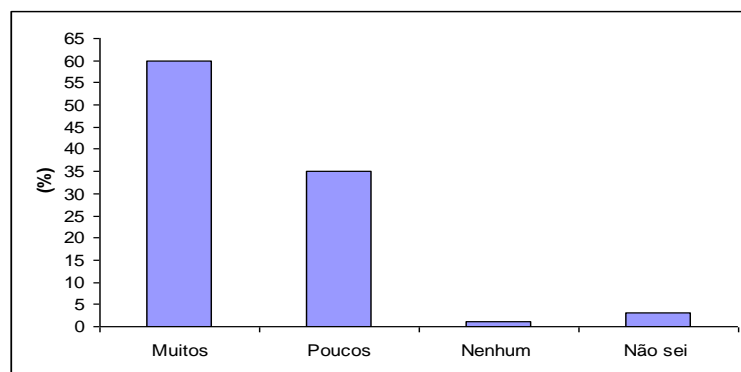
**Figura 3.** Percentual de respostas dadas como relação a pergunta sobre as fontes de conhecimento sobre meio ambiente.

A análise das repostas mostrou a importância de todas as fontes de comunicação, em especial a televisão (91%), os jornais (65%) e a internet (70%). Esse dado demonstra o poder de influência dos meios de comunicação em massa junto à população, em especial a televisão, que pode ser explorado para chamar a atenção do público em geral para as questões ambientais e que pode auxiliar na busca pela sensibilização da população. Segundo Silva (1978), os meios de comunicação podem ter um papel inicial em campanhas em direção a mudanças de opinião e comportamento, porém ressalta a comunicação interpessoal, concluindo que uma combinação das duas formas pode gerar resultados melhores ainda, buscando a formação de uma consciência ecológica. Ainda nessa questão, pode-se perceber a importância da internet como uma fonte de informação. Tal fato demonstra o eficaz processo de inclusão digital que o Brasil vem passando. A pesquisa não levantou os locais onde os moradores encontram acesso a internet,

mas revela a tendência nacional de inserção de todas as comunidades aos meios virtuais, como prevê o Ministério de Ciência e Tecnologia.

Seguindo na análise de questionamentos a respeito de meio ambiente feitas aos moradores de Lucrécia, questionou-se a sua preocupação com o meio ambiente. A premissa básica para que trabalhos de sensibilização possam ser realizados em determinadas comunidades é que haja um envolvimento por parte dos moradores e que estes se preocupem e procurem soluções para os problemas ambientais locais. Do total de participantes arrolados, 87% responderam que se preocupam com o meio ambiente, 10% responderam que se preocupam às vezes e apenas 3% afirmaram que não se preocupam. Este dado é bastante satisfatório, pois sugere que a preocupação ao qual a maioria dos participantes afirmou ter, seja um ponto de partida para a sensibilização e procura por soluções dos problemas.

No que concerne aos problemas ambientais, 60% dos participantes afirmaram que na sua cidade existem muitos problemas ambientais (Figura 4). Os problemas mais citados estão na tabela 2.



**Figura 4.** Percentual de respostas referente a pergunta: Você acha que existem problemas ambientais na sua cidade?

**Tabela 2.** Problemas ambientais mais citados pelos participantes

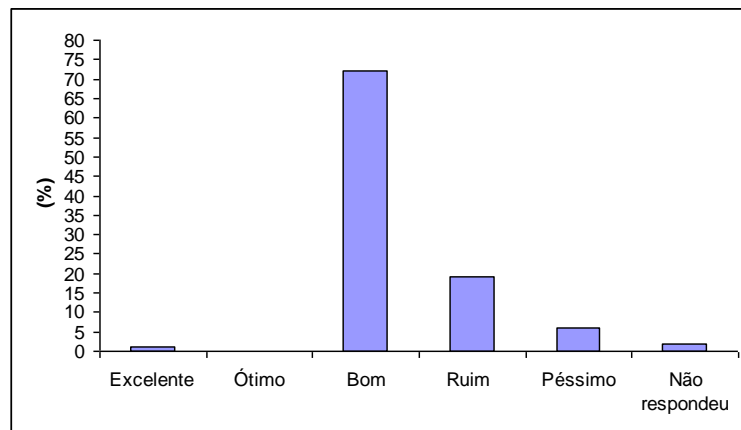
<b>Problemas Ambientais Citados</b>	<b>Nº de Citações</b>
Poluição do açude e dos rios	60
Falta de Tratamento dos Esgotos	31
Lixo	24
Animais soltos na área urbana	23
Poluição do ar	17
Queimadas	10
Desmatamento	8
Falta de conscientização das pessoas	7

Observa-se que a poluição aquática, tanto do açude quanto dos rios que passam pela cidade, foi o problema ambiental mais citado, seguido pela falta de tratamento de esgotos. Segundo Petrovich & Araújo (2009), apesar da grande importância que os açudes apresentam em regiões onde os recursos hídricos são escassos, estes são constantemente afetados negativamente, acentuando assim a perda da qualidade da água, especialmente no açude em questão, onde trabalhos já relataram a presença de poluentes (MARCON *et al.*, 2010). Esse fato, ao que parece, já faz parte da realidade dos moradores de Lucrécia, que já reconhecem a poluição que afeta os corpos hídricos e até mesmo, alguns deles já reconhecem que essa poluição pode ser originada da falta de tratamento dos esgotos que vão

diretamente para o açude, como pode ser identificado na resposta de um participante: “*Tratamento inadequado da rede de esgotos causando poluição do açude*”

Mesmo com a maioria dos entrevistados afirmando que existem muitos problemas ambientais na sua cidade, quando questionados se no seu dia-a-dia o participante considera que causa algum prejuízo ao meio ambiente, paradoxalmente, 69% responderam que causam poucos prejuízos, 23% que causam muitos, 4% que não causam nenhum prejuízo e 4% não souberam responder. Segundo Lermen (2008), esse dado não é recorrente apenas nessa pesquisa e na pesquisa realizada pela autora citada, mas se caracteriza como uma máxima da cultura e paradigma do brasileiro. A maioria dos participantes espera que cada morador faça a sua parte, mas se coloca em último lugar na ordem dos responsáveis, o que revela o baixo reconhecimento da responsabilidade pessoal diante do meio ambiente ao qual está inserido. Fazendo uma analogia, segundo Almeida e Kurtz dos Santos (1999), é mais fácil pensar sobre as suas casas produzindo esgotos, do que fazer a relação entre o esgoto produzido pelas pessoas que habitam as casas.

Para finalizar esse eixo temático do questionário, foi perguntado aos participantes qual o nível de satisfação com o meio ambiente do seu município. O percentual das respostas está indicado na figura 5.



**Figura 5.** Percentual de repostas com relação ao nível de satisfação com o meio ambiente do município.

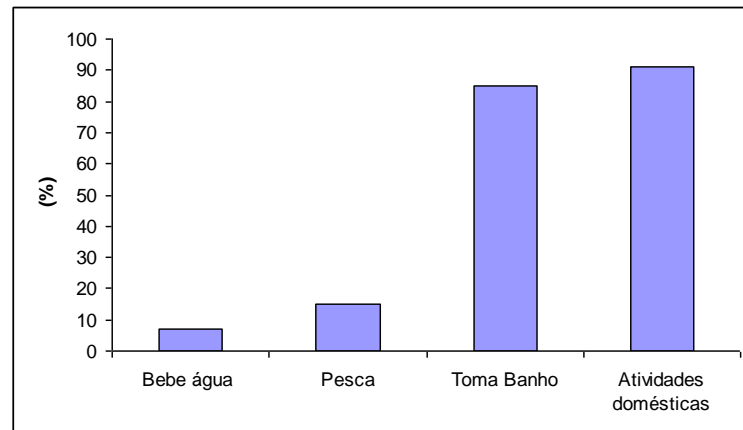
Amorim Filho (1996) considera que os sentimentos de afeição, indiferença ou aversão do homem pelos lugares com os quais tem alguma forma de contato, possuem um papel importante – e, em muitos casos, decisivo na formação de juízo de valor, de atitudes e em última análise, de ações sobre esses lugares e paisagens. Nesse mesmo sentido, os estudos de Tuan (1980), ressaltam a importância de se investigar as paisagens valorizadas como forma de identificar sentimentos de afetividade (Topofilia) ou de aversão (Topofobia). Analisando as respostas dadas pelos participantes, observa-se que a grande maioria dos participantes (72%) afirmou ter um nível de satisfação bom com o meio ambiente do seu município, demonstrando que eles possuem laços de afetividade com o local em que vivem.

### 3.3- Questões relativas ao açude de Lucrécia

Segundo Silans (2008), a escassez de água é um dos principais entraves ao desenvolvimento em particular no Nordeste brasileiro e mais especificamente no semi-árido. Para contornar essa situação, os açudes foram construídos e se caracterizam como um elemento fundamental ao ambiente dessas regiões e constituem uma forte ligação do homem com a natureza (GALVÃO, 2005). Para

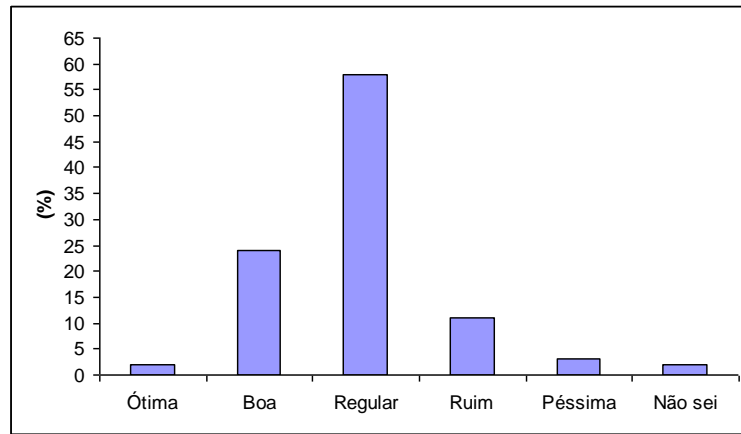
MOURA (2008) a identidade com o lugar é o ponto de partida para a discussão da percepção que os moradores têm do seu espaço vivido. Assim, procurou-se identificar a importância e o uso que os moradores de Lucrécia fazem do açude do seu município, assim como as percepções que lhes são impressas.

Inicialmente, procurou-se entender de que forma os participantes utilizavam as águas do açude. Observou-se que a grande maioria dos moradores utiliza as águas apenas para as atividades domésticas e para o lazer (Figura 6). Através desse dado, pode-se também inferir que os participantes percebem que a água de açude apresenta problemas, fato demonstrado ao indicarem que eles não a utilizam para beber, quando retirada diretamente do açude.

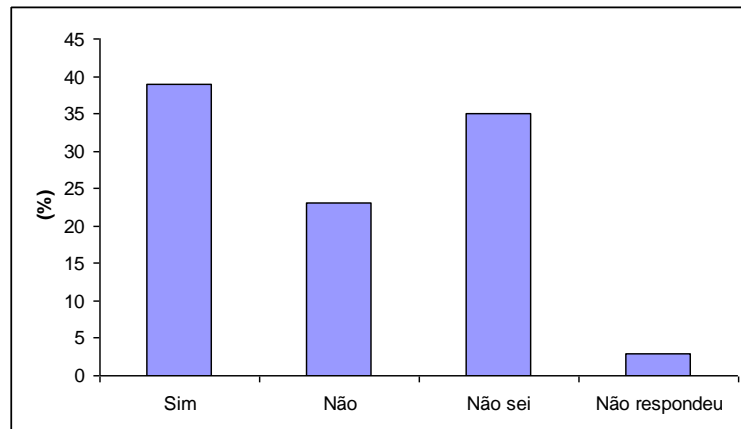


**Figura 6.** Percentual de respostas sobre os usos que os moradores de Lucrécia fazem do açude da cidade.

A água doce é um recurso natural essencial a vida e finito, cuja qualidade vem piorando devido ao aumento da população e à ausência de políticas públicas voltadas para a sua preservação. Estima-se que 80% de todas as moléstias e mais de um terço dos óbitos em países em desenvolvimento sejam causados pelo consumo de água contaminada, e, em média, até um décimo do tempo produtivo de cada pessoa se perde devido a doenças relacionadas à água (Agenda 21, 1992). Visto essa problemática em relação à qualidade da água e os possíveis riscos que ela pode causar a saúde humana, foi perguntado aos participantes sobre qual o conceito que eles dariam a qualidade da água do açude e posteriormente se eles achavam que essa água poderia prejudicar a saúde. De acordo com o percentual de respostas obtido (Figuras 7 e 8), pode-se observar que os participantes já possuem um conhecimento intrínseco em relação a baixa qualidade apresentada pela água do açude, já que 58% classificaram a qualidade da água como regular. Aliado a isso, cerca de 39% dos entrevistados acreditam que a água pode causar efeitos danosos a saúde, enquanto que 35% ficaram em dúvida, evidenciando a desconfiança que eles possuem sobre esse aspecto.

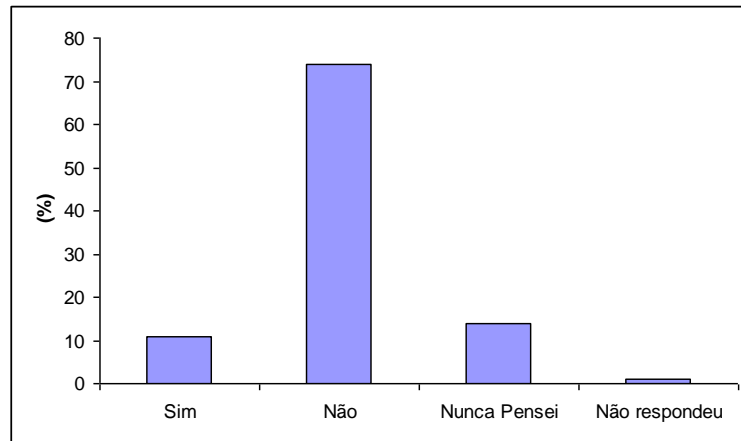


**Figura 7.** Percentual das respostas sobre a qualidade da água do açude de Lucrécia.



**Figura 8.** Percentual de respostas para a pergunta: Você acha que a água do açude pode prejudicar a sua saúde?

Entretanto, mesmo com a possível desconfiança sobre os problemas reais que a água do açude pode oferecer, 74% dos moradores afirmaram que não conseguem imaginar o município sem o açude (Figura 9). Isso demonstra que os participantes possuem uma forte ligação com o açude e o reconhecem como elemento indispensável ao ambiente e às suas vidas. Nas regiões semi-áridas, os açudes representam não somente uma fonte de água, mas também se encontram no imaginário popular como fonte de vida e esperança e possuem um significado bastante amplo, pois estão relacionados com a própria fixação do homem no campo (PETROVICH & ARAÚJO, 2009).



**Figura 9.** Percentual de respostas dadas a pergunta: Você consegue imaginar seu município sem o açude?

Com o objetivo de compreender melhor essa relação entre os moradores e o açude, foi feita uma pergunta aberta sobre o que o açude representava para os participantes. Para a análise, as respostas foram categorizadas em positivas, quando foi possível observar os aspectos que demonstravam algum grau de importância benéfica do açude para o participante, e negativas, nas quais a representação apresentava algum aspecto maléfico. Dos 100 questionários analisados, 90% deles apresentaram respostas que se enquadraram na categoria das respostas positivas, como pode ser visto em algumas respostas dadas a seguir:

*“Para mim representa a vida para Lucrécia”;*

*“Marco cultural, econômico e sem dúvidas indispensável para o município”;*

*“Lazer, fonte de renda, além de ser um patrimônio municipal indispensável”;*

*“O açude é importante para as atividades de agricultura e pesca do município, e faz todo abastecimento de água do nosso município e de algumas circunvizinhas. Além de ser um ponto ambiental que representa a cidade.”*

Entretanto, apesar da grande maioria enfatizar esses aspectos positivos, 4% dos participantes não responderam a esta questão e 6% dos participantes tiveram suas respostas enquadradas na categoria de respostas negativas, por apresentar em seu conteúdo aspectos que representavam pontos negativos, como evidenciado nas respostas abaixo:

*“Para minha pessoa o açude representa uma grande poluição através de doenças, etc.”;*

*“Risco para a população pela concentração de metais”;*

*“Se a água dele não fosse poluída, seria muito bom, que ele possui muita água, mas não presta para consumir pois é contaminada.”*

A análise dessa questão aberta corroborou com os resultados encontrados na questão anterior e, a partir dela, foi possível perceber o importantíssimo significado que este açude tem para os moradores locais nos mais amplos significados que ele possa agregar consigo.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com o conjunto de dados obtidos, o presente estudo permite concluir que:

- Os moradores do município de Lucrécia reconhecem os elementos que compõem o meio ambiente, sendo que uma pequena parcela exalta a visão naturalista;

- A associação entre a escolaridade e o conhecimento sobre meio ambiente, mostrou a importância de uma formação escolar continuada;
- A grande maioria dos entrevistados se preocupa com o meio ambiente e acredita que na sua cidade existem muitos problemas ambientais;
- Os entrevistados se ausentam das suas responsabilidades pessoais frente aos problemas ambientais do seu município;
- Quando questionados sobre o açude de Lucrécia, os participantes reconhecem a importância dele para a cidade e possuem uma forte ligação com o mesmo, entretanto, pode-se observar que mesmo com os laços topofílicos criados com o lugar, isso não interfere na sua percepção quanto aos problemas que essa água possa apresentar;
- Afere-se que a comunidade de Lucrécia é um campo aberto para políticas e trabalhos de educação ambiental, pois seus moradores mostraram-se abertos a ações que visem à melhoria da qualidade de vida, pois não conseguem perceber o município sem o açude e, ao mesmo tempo acreditam que as águas do açude podem prejudicar suas vidas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A água tem fundamental importância para a manutenção da vida no planeta, e em especial, nas regiões onde sua escassez é um fator limitante. Falar da relevância dos conhecimentos sobre a água, em suas diversas dimensões, é falar da sobrevivência da espécie humana, da conservação e do equilíbrio da biodiversidade e das relações de dependência entre seres vivos e ambientes naturais (BACCI & PATACA, 2008). Por esse motivo, esse recurso natural merece a atenção dos setores acadêmicos, sociais e políticos.

Assim a socialização do conhecimento ambiental pode partir da complexidade que envolve o tema água. Os conhecimentos sobre a origem da água, o ciclo hidrológico, os aquíferos, a relação precipitação-vazão servem para inserir a população num amplo e complexo processo de interação na natureza e relacioná-la com a sociedade (usos múltiplos, ocupação de áreas de mananciais, riscos ecológicos, poluição, contaminação e gestão dos recursos hídricos). Além disso, essa temática pode ser o eixo condutor de diversas disciplinas, propiciando o desenvolvimento de práticas escolares científicas e funcionar como agente integrador das disciplinas na construção de uma visão abrangente da natureza.

Neste contexto, estudos de percepção ambiental podem funcionar como instrumento diagnóstico da situação de uma determinada comunidade em relação ao seu saber/agir ambiental e, além disso, esta percepção pode ser compreendida como o primeiro estágio para a formação e a sensibilização ambiental, tornando-se parte primordial para futuros projetos de educação ambiental.

Dessa forma, espera-se que os dados obtidos neste trabalho possam servir de base para a elaboração de atividades de educação ambiental na região semi-árida do Estado do Rio Grande do Norte. Partindo das necessidades detectadas por esse questionário, as atividades podem ser mais bem estruturadas e dirigidas para auxiliar na disseminação das características típicas de cada localidade, visando atingir o objetivo principal que é a sensibilização da população para os problemas locais, em especial, a questão dos recursos hídricos em regiões de seca e como preservá-los.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENDA 21. Proteção da qualidade e do abastecimento dos recursos hídricos: aplicação de critérios integrados no desenvolvimento, manejo e uso dos recursos hídricos. Rio de Janeiro, 1992.

AMORIM FILHO, O. B. Topofilia, Topofobia e Topocídio em MG. In: DEL RIO, V.; OLIVEIRA, L. (Org.). **Percepção Ambiental: a experiência brasileira**. São Paulo: Nobel, 1996.

ALMEIDA, M. T.; KURTZ DOS SANTOS, A. C. Um estudo com alunos do ensino fundamental de Rio Grande, sobre problemas sócio ambientais no entorno da escola, tendo como base a modelagem semiquantitativa: resultados parciais. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, Rio Grande, RS, nº5, p. 199-217, 1999.

BACCI, D. C; PATAÇA, E. M. Educação para água. **Estudos avançados**, n ° 22, v. 63, p. 211-226, 2008.

BAPTISTA, G. M. M.; CARVALHO, J. M., CAMACHO, R. G. V., RIBEIRO, R. J. S.; BIAS E. S., ZARA, L. F. **Comportamento sazonal da vegetação da Caatinga na região de Lucrecia, RN, em 2003 e 2004, por meio dos dados sensor CCD do CBERS-2**. In: Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil, INPE, p. 797-804, 2005.

BARIZAN, A. C. C. **Representações sociais sobre a temática ambiental de licenciados em Ciências Biológicas: subsídios para repensar a formação inicial de professores**. Bauru: Universidade Estadual Paulista (Dissertação), 2003.

BEZERRA, T. M. O.; FELICIANO, A. L. P; ALVES, A. G. C. Percepção ambiental de alunos e professores do entorno da Estação Ecológica de Caetés – Região Metropolitana do Recife-PE. **Biotemas**, nº 21, p. 147 – 160, 2008.

DORNELLES, C. T. A. **Percepção ambiental: uma análise na bacia hidrográfica do rio Monjolino, São Carlos, SP**. São Paulo: Universidade de São Paulo (Dissertação), 2006.

FAGGIONATO, S. **Percepção ambiental**. Disponível em: <[www.educar.sc.usp.br/textos](http://www.educar.sc.usp.br/textos)>. Acessado em 21/ 04/ 2009.

GALVÃO, M. L. M. **Acari-RN: Da construção do território aos limites da pobreza**. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Dissertação), 2005.

**Instituto Nacional Do Câncer – INCA**. Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em:<[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em 05 de Julho de 2009.

LEME, D. M. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de águas e de sedimentos do Rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto do vazamento de oleoduto da região**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Dissertação), 2007.

LERMEN, H. S. **Percepção ambiental dos moradores da vila parque Santa Anita- Porto Alegre**. Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul (Monografia), 2008.

MACEDO, R. L. G. **Percepção, conscientização e conservação ambientais**. Lavras: UFLA- Universidade Federal de Lavras/FAEPE- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, 2005.

MARCON, A. E.; FERREIRA, D. M.; MOURA, M. F. V.; CAMPOS, T. F.C.; AMARAL, V. S.; AGNEZ-LIMA, L. F.; DE MEDEIROS, S. R. B. "Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity." **Chemosphere**, 2010, in press.

MARCZWSKI, M. **Avaliação da percepção ambiental em uma população de estudantes do ensino fundamental de uma escola municipal rural: um estudo de caso**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Dissertação) 2006.

MARIN, A. A.; TORRES, O. H.; COMAR, V. "A educação ambiental num contexto de complexidade do campo teórico da percepção". **Interciência**, n° 10, vol. 28, p. 616-619, 2003.

MATTAR, F. N. **Pesquisa de Marketing: metodologia, planejamento, execução e análise**. São Paulo: Atlas, 1994.

MOURA, N. Percepção e Memória: uma barragem, muitas vidas, uma história. **Caminhos da Geografia**, Uberlândia, v. 9, n° 27, p. 70-81, 2008.

OLIVEIRA, L. A.; SOUTO, R. Q.; TAVARES, A. C.; SILVA M. M. P.; CEBALLOS, B. S. O. **Percepção ambiental e viabilidade da educação ambiental em comunidades do cariri paraibano para o uso sustentável dos recursos hídricos**. In: Anais do 24<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Belo Horizonte – MG, 2007, p.1-7.

PETROVICH, A. C. I; ARAUJO, M. F. F. Percepção de professores e alunos sobre usos e a qualidade da água em uma região semi-árida brasileira. **Educação Ambiental em Ação**, n° 29, 2009.

REIGOTA, M. **Meio Ambiente e Representação Social**. São Paulo: Cortez, 2001.

REMPEL, C.; MÜLLER, C. C.; CLEBSCH, C. C.; DALLAROSA, J.; RODRIGUES, M. S.; CORONAS, M. V.; RODRIGUES, G. G.; GUERRA, T.; HARTZ, S. M. Percepção Ambiental da Comunidade Escolar Municipal sobre a Floresta Nacional de Canela, RS. **Revista Brasileira de Biociências** v. 6, n° 2, p. 141-147, 2008.

SANTOS, S. P.; MACEDO, S. **Educação Ambiental: o que indicam as representações sociais de meio ambiente e percepção ambiental de educandos do ensino fundamental – 6° ano**. Universidade Federal de Uberlândia, p. 1-8, 2008. Disponível em <<http://www.ic-ufu.org/anaisufu2008/PDF/SA08-20139.PDF>> Acessado em 20 de Março de 2010.

SERRA, C. V. **Abordagem humana integrada a estudos de uma problemática ambiental no interior do Rio Grande do Norte**. Brasília: Universidade Católica de Brasília. (Dissertação), 2006.

SILANS, A. M. B. P. Gestão dos Recursos Hídricos. In: ANDRADE, M. O. (org.) **Meio Ambiente e o Desenvolvimento: Bases para uma formação interdisciplinar**. João Pessoa: Editora Universitária da UFPB, 2008.

SILVA, C. E. L. A conscientização ecológica do público. In: SILVA, C.E.L. (org.) **Ecologia e Sociedade: uma introdução as implicações da crise ambiental**. São Paulo: Edições Loyola, 1978.

SIQUEIRA, R. C. Política ambiental para quem?. **Ambiente & Sociedade**, Campinas, nº 2, v. 11, p. 425-437, 2008.

TUAN, Y. **Topofilia – Um Estudo da Percepção, Atitudes e valores do Meio Ambiente**. São Paulo: DIFEL, 1980.

TUNDISI, J. G. Recursos Hídricos. **MultiCiência**, 2003. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_01/A3\\_Tundisi\\_port.PDF](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_01/A3_Tundisi_port.PDF)>. Acessado em 10 de Fevereiro de 2010.

## **CAPÍTULO II**

### **STUDY ON WATER QUALITY AND MUTAGENICITY OF A SURFACE WATER FROM A SEMI-ARID REGION BY MICRONUCLEUS ASSAYS**

**ESTE ARTIGO SERÁ SUBMETIDO AO PERIÓDICO SCIENCE OF TOTAL ENVIRONMENT E, PORTANTO, ESTÁ FORMATADO DE ACORDO COM AS RECOMENDAÇÕES DESTA REVISTA (ANEXO C).**

STUDY ON WATER QUALITY AND MUTAGENICITY OF A SURFACE WATER  
FROM A SEMI-ARID REGION BY MICRONUCLEUS ASSAYS

A. C. F. S. Garcia <sup>a</sup>, A. E. Marcon <sup>a</sup>, Ferreira, D.M <sup>b</sup>, E. A. B. Santos <sup>c</sup>, V. S. Amaral <sup>a</sup>, S. R. Batistuzzo de Medeiros <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

<sup>b</sup> Laboratório de Recursos Naturais, Instituto Federal de Tecnologia do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Sergipe (UFS).

\* Corresponding author:

Dra. Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros.

Departamento de Biologia Celular e Genética, CB – UFRN

Av. Salgado Filho, s/n - Campus Universitário

Lagoa Nova

Natal, 59072-970, RN, Brazil

Tel.: # 55.84.3211-9209; Fax # 55.84.3215-3346

E-mail address: [sbatistu@cb.ufrn.br](mailto:sbatistu@cb.ufrn.br)

**Abstract**

The present study evaluated the mutagenic potential of the surface water from the Lucrecia dam by analyzing micronuclei in *Tradescantia pallida* (Trad-MCN) and in human peripheral blood lymphocytes (CBMN) assay, which correspond an *in vivo* and *in vitro* system, respectively. In addition, heavy metals and some physicochemical properties were measured. Water samples were collected on 2009 November (dry season) and 2010 May (rainy season), in three distinct points. The results of both assays for the raw water showed positive responses for the points analyzed when compared to the respectively negative control. Using the CBMN assay it was possible to verify that the water diluted was still capable to induce a significant increase in micronucleus frequency. The highest MN medium was observed in the dry season for both assays. Chemical analyses detected an increase of heavy metal levels in the sample points and different seasons. These results point out the presence of genotoxins in this water, involving heavy metals, which may be affecting the entire ecosystem, including human health. It is recommended a longer water quality monitoring to provide a better characterization of this public supply.

**Key words:** CBMN, *Tradescantia pallida*, water pollution, genotoxicity, heavy metals

## 1. Introduction

The water quality of many reservoirs in the world has been reduced due to percolation of contaminants to water, which can have natural or anthropogenic origin, increasing the level of genotoxic compounds in aquatic ecosystems. This fact has contributed to the reduction of environmental quality, and commitment the health of living beings that inhabit these ecosystems, including the human population (Ohe et al., 2004; Lemos et al., 2007; Liu et al., 2009).

In this backdrop of reduced water quality, is the Lucrecia dam (Figure. 1), which is a major surface water reservoirs by volume of semi-arid region of Rio Grande do Norte, Brazil, and that has shown contamination by heavy metals, cyanobacteria toxic, presence of alpha and beta radiation and a potential of genotoxicity using fishes from this dam (Marcon et al., 2010). The population that use this source has been showing high rates of cancer, popularly associated with the consumption of this water, with a prevalence about three times higher compared to the whole state of Rio Grande do Norte (INCA-BRAZIL, 2007). It has been proven by some studies that the pollution of water source has certain relationship with endemic cancers of human beings (Zhang et al., 2003; Villanueva et al., 2007)

In order to study environmental genotoxicity, it should be understood that the environmental sample consists of a complex mixture of substances that requires the choice of different methods for genetic evaluation. Among these methods, the micronucleus test is one of the most widely used and is gaining increased attention among laboratories active in the field of environmental mutagenesis. Different cells from different organisms are being used for this analyses such as plants (Barbosa et al., 2010), molluscs (Danellakis, et al., 2011), fish (Egito et al., 2010), human oral mucosa (Bortoli et al., 2009), human cell line (Hashizume et al., 2009) and human lymphocytes (Wnuk et al., 2009).

The *Tradescantia* micronucleus bioassay (Trad-MCN) is very useful tool for screening the mutagenic potential in the environment due the capability to detect low-level genotoxicity

in either short-term in situ exposures or in vivo tests with un-concentrated water samples (Rodrigues et al., 1997; Knasmuller et al., 2002; Misik et al., 2006). On the other hand, the micronucleus in peripheral blood lymphocytes has been considered as a predictive of increased cancer risk in human population (Bonassi et al., 2007; Murgia et al., 2008).

The aim of this study is to assist the evaluation of the genotoxicity from the Lucrecia dam, by micronucleus test, using two systems an in vivo (TRAD-MCN) and other in vitro (CBMN) in a dry and a rainy season. Also, the levels of cadmium, copper, zinc, lead, chromium, manganese and nickel were measured.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Collection sites and sampling**

In order to assess the genotoxicity of the Lucrecia dam, three monitoring sites were chosen (Figure 1): P1 (6° 33' 7.62"S/ 93° 23' 51.5"W) is located near the water up-take for public distribution by CAERN and is the point more accessible for the population; P2 (6° 31' 4.48"S/ 93° 23' 8.46"W) is in the opposite side of P1 and is located at the confluence of tributaries rivers; P3 represents the tap water of the houses.

Water samplings were carried out in November 2009 and May 2010, corresponding dry and rainy season, respectively. About 3 L of surface water for each point was collected in a pre-cleaned amber flasks at a depth of ~50 cm, stored at 4 °C for 4 days, and then divided into aliquots and kept in a freezer at -20 °C as described in Vargas et al (2001).

### **2.2. Water chemical analysis**

The levels of Cadmium, Copper, Zinc, Lead, Chromium, Manganese and Nickel were determined by atomic absorption flame spectrometry. Also, some physicochemical characterization such as pH, turbidity, total floating solids, ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). All these characterization was done following the APHA (2005) guidelines.

### **2.3. Tradescantia Micronucleus Assay**

This assay was carried out using *Tradescantia pallida* according to the protocol of Ma (1981). Young stems with inflorescences of *T. pallida* were collected from plants cultivated in humus soil and fertilized with a formulation of N:P:K (10:10:10). The plants were kept in full sun and watered daily with distilled water, maintaining the ideal conditions. For the micronucleus tests, we used the raw water (undiluted) of each point sampled. In this study, formaldehyde (0,2%) was used as a positive control and distilled water was utilized as a negative control.

In conducting the bioassay, about 15-30 cuttings of *T. pallida* for each point were collected and maintained in the hydroponic system with Hoagland solution for 24 hours. After that, the cuttings were immersed in a 560 mL of the water to be assayed. The duration of the exposure time was 12 h followed by a process of recovery for 24 h with Hoagland solution. After that, the inflorescences were fixed in 1:3 aceto-ethanol (Carnoy's) solution for 24 hours and stored in 70% alcohol.

Slides were prepared from the buds, and the micronucleus frequency in meiotic pollen mother cells was evaluated (Ma et al., 1981). A total of 3000 tetrads were scored for each sample. The data were expressed as MCN/100 tetrads.

### **2.4. Lymphocyte culture and CBMN assay**

A 5 mL peripheral blood was obtained once from three healthy young donor males with normal karyotypes. For each donor, one series of cultures was prepared with two parallel cultures for every sample tested. In this test, were used not only the raw water but also the water diluted to 50% and 25%, to evaluate the dose response.

Whole blood cultures were then set up according Huang et al. (2009). Briefly, 0.3 mL of whole blood was added to 4.7 mL of RPMI 1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 5% phytohaemagglutinin (PHA). Twenty-four hours after PHA stimulation, cultures were supplemented with 200  $\mu$ L of water samples,

which were previously sterilized in a Sartorius filter with a 0.22  $\mu\text{m}$  pore membrane. The negative control was sterile distilled water and the positive control was 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Mitomycin-C. Forty-four hours after PHA stimulation 4,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cytochalasin B was added to the cultures to accumulate cells that had completed one nuclear division at the binucleated stage (Fenech, 2000). Blood cultures were incubated for a total of 72 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The lymphocytes were collected by centrifuge (1000 rpm  $\times$  5 min), and then treated with 0,075M KCl followed by fixing 3 times in 5 mL methanol/glacial acetic acid (3:1). The cell suspension was dropped on a slide, stained with Giemsa (1:40 phosphate buffer pH= 6,8) and then the frequencies of micronuclei were measured in 1.000 binucleated cells, for each donor, totalizing 3.000 cells per sample, according to Fenech (2003).

As a parameter for cytostatic, the nuclear division index (NDI) was assessed according to the formula:  $\text{NDI} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})]/\text{N}$ , where M1-M4 indicate the number of cells with 1-4 main nuclei and for which 1000 cells per donor/sample (N) were scored, as recommended by Fenech (2007).

## **2.5 Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using the R software 2.12.0 (R Development Core Team, 2010). The variables were assessed for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. For TRAD-MN the difference groups among sample sites were determined by ANOVA followed by Tukey test as a post hoc test. For the comparisons of the means of MN in human lymphocytes was used Kruskal-Wallis Test. Statistical differences were considered significant for  $p \leq 0,05$ .

### 3. Results

#### 3.1 Physicochemical and heavy metals characterization

The physicochemical characterization of the surface waters in the different seasons, is summarized in Table 1. All the properties analyzed like pH, turbidity, amonio, nitrite and nitrate, were within the limits allowed by the Brazilian law (Portaria 518 MS, 2004).

The concentrations of the seven metals analyzed are shown in Table 2. At the dry season the level of Copper at the P1, were 38-fold higher than the Maximum Permitted Level (MPL) for class 2 and 3 waters, according to CONAMA (2005) and above the criteria maximum concentration of chemical hazards in drinking water (WHO, 2003). For Cadmium, all three collected points (P1, P2, P3) showed concentrations above the established for CONAMA (2005) and P1 and P2 above the criteria maximum concentration of chemical hazards in drinking water (WHO, 2003). Also, in P3 it was found Copper above the Brazilian legislation. On the other hand, in the rainy season, were found levels of Cadmium (P2), Lead (P1), Manganese (P1 and P2) and Nickel (P2) above the allowed limits of both agencies.

#### 3.2. Tradescantia Micronucleus Assay

The frequency of micronuclei in the Trad-MCN observed for each sample site, for dry and rainy season are summarized in Table 3. All the water samples collected in the dry season showed a significant increase in MN frequency compared to the negative control. In the rainy season, only the P2 shows an increase in the MN frequency.

Comparing the respective points in the different seasons, it was observed that P1 in dry season showed a significant increase in the MN frequency when compared to the rainy season ( $p < 0,001$ ).

#### 3.3. Lymphocyte culture and CBMN assay

Table 4 shows the results obtained by the analysis of CBMN assay in human lymphocytes induced by water samples from the Lucrecia dam. In this assay, water was also

diluted to 50% and 25% to observe the concentration-response in the micronucleus frequency. This frequency was proportional to the water concentration.

In the dry season, the P1 was statistically significant for the three water concentrations compared to control, as well as the P2 was significant for the raw water and water diluted to 50%. The P3 did not show positive response for any sample. In the rainy season, P1 and P2 were statistically significant only for the raw water. Analyses were performed between the respective points for the raw water comparing the dry and rainy seasons and it was not found statistical difference between the seasons, although in the dry season the MN medium was higher.

Besides the micronucleus frequencies, the values of Nuclear Division Index are also shown in the Table 4. This index showed no significant difference between the samples and the negative control, showing that the samples are not cytotoxic to human lymphocytes.

#### **4. Discussion**

Contamination of water used for public supply is considered a major risk factor for human health. The high concentrations of xenobiotics from urban, agricultural and industrial wastes contributed to the increase of the genotoxic activity of aquatic environments (Pereira et al., 2007; Caffeti et al., 2008). One of the most concern contaminants is the heavy metals, due to persistence leading to the instability of the ecosystems. They are highly toxic and, unlike the organic compounds, are not biodegradable (Valko et al., 2005). The presence of them in water samples above those allowed limits by environmental agencies is a strong indicator of anthropogenic activities (Mendiguchia et al., 2007). In the present study the levels of some metals, such as cadmium, copper, lead and manganese, showed results above the maximum limits permitted by CONAMA (2005) and WHO (2003) at different sampling points and seasons. Similar results was found by Barbosa et al. (2010), who analyzed the water from Extremoz lake, in the same state of our study, and found some metals above the maximum

values allowed by Brazilian legislation. A study performed by Marcon et al. (2010) in the Lucrecia dam from 2006 to 2009, showed the presence of heavy metals demonstrating that over the years there is not a decrease in these metals. This fact suggests that the presence of heavy metals in this water is a serious problem due to their persistence.

Since the economic and social importance of the Lucrecia dam for the population, it is necessary to use different organisms and experimental models, to obtain a larger panorama of the mutagenic activity of the surface water from this dam, in order to clarify the real risks that this water can bring. In this present study, it were used an *in vivo* and *in vitro* system. The *in vivo* assay, using the Trad-MCN, revealed a significantly increase in the average frequency of micronuclei for the points analyzed at the different seasons. Similar results for the *in vivo* genotoxicity assay carried out by Marcon et al. (2010), using the levels of micronucleus and nuclear abnormalities of *Oreochromis niloticus* collected in the Lucrecia dam. These findings in both *in vivo* studies suggest that all organisms living in this ecosystem probably may be affected.

The Trad-MCN assay in this study showed to be effective and sensitive to analyze the water genotoxin effects. In a studies conducted in rivers of China (Duan, et al., 1999) and Austria (Steinkellner et al., 1999), using Trad-MCN, the results of both showed that this assay was also sensitive to detect the genotoxicity of these rivers. Although the Trad-MCN is nowadays being used worldwide to monitoring the air (Meyreles et al., 2009; Alves et al. 2011), urban sludge (Mielli et al., 2008), and soil (Cesniene et al., 2010), there are no recent reports using the micronucleus test in *Tradescantia* to analyze water pollution. Another relevant point is that the plant most frequently used in the Trad-MCN is the clone #4430, but for hot climates, like the Northeast of Brazil, this plant has not been adapted. In accordance with some authors who showed similar sensitivity of both species plants (Suyama et al., 2002; Mielli et al., 2008) and use the *Tradescantia pallida* as a bioindicator (Carvalho-Oliveira et al., 2005; Carreras, et al, 2006; Alves et al., 2007), we reinforce the suggestion that the *T.*

*pallida* can replace the Clone #4430 in the Trad-MCN assay. Furthermore, this study is pioneer in Brazil using the micronucleus test in *Tradescantia pallida* to evaluate the water resources. Thus, due to versatility, practicality and reliability, the *T. pallida* micronucleus test can provide a first indication of warning about the situation of water quality under real conditions and can be used along with other bioassays and physico-chemical analyses, for monitoring threatened ecosystems.

Considering that Trad-MCN assay was first used for us to make a preliminary screening of the mutagenic pollution in this area, the CBMN assay in human lymphocytes was carried out to investigate the response in an in vitro system, using human cells. It can be observed that the micronucleus frequencies decays proportionally with the increase of dilution for all points analyzed, demonstrating a high concentration of genotoxins in water undiluted. Similar study carried out by Amaral et al. (2005) employed the SMART in *Drosophila melanogaster* to evaluate the genotoxicity of Caí river and the genotoxic analysis were tested at crude samples and at 50% and 25% concentrations. El Asslouj et al. (2009) performed the CBMN assay to assess the genotoxicity from Bounoumossa river adding to the lymphocytes culture respectively 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L and 400  $\mu$ L of wastewater from this river and found an increase in micronucleus frequency in proportion to increasing doses. The importance of use this assay is to the fact that micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is associated with early events in carcinogenesis, being a predictive of cancer risk (Bonassi et al., 2007). Because of this, the CBMN in human lymphocytes has been extensively used in molecular epidemiology and cytogenetic for the biomonitoring of human populations exposed to genotoxic agents or bearing a susceptible genetic profile (Jiang et al., 2010; Wang et al., 2010).

Using the CBMN assay, it was also possible to detect that Point P1 was genotoxic not only to the raw water as well as to the 50% and 25% diluted water analyzed in the dry season, followed by Point P2, which showed positive responses for raw water and 50% diluted water.

The importance of using the dilution in water samples is the fact that it becomes clearly the toxicity impacts of this water, involving cytotoxicity and/or genotoxicity effects that the different concentrations may present. In this study it was possible to demonstrate that in dry period the concentration of genotoxins is so high that even when the water is diluted still observed significant mutagenic responses.

In the Point P1 it was found Cu>Cd for dry season and Mn>Pb for rainy season. In the Point P2 it was observed in dry season only the presence of Cd and in the rainy season Mn>Ni>Cd. In the P3, it was observed the presence of Cu>Cd in dry season. Metals form a particularly complex class of mutagen, since they can interact in different ways with the cellular machinery (Mateuca et al., 2006). The adverse effects of some heavy metals in DNA of plants, animals and humans are well documented and known that they can lead to decreased fertility and cancer induction (Majer et al., 2002; Goyer, et al., 2004; Lu et al., 2005; Barbosa et al., 2010). This action is due to two main mechanisms, oxidative damage and interference with DNA replication and repair (Valko et al., 2006; Joseph, 2009).

Studies about Copper (Cu) have shown that this metal is required in trace amounts for metabolic pathways, but is toxic in excess amounts, causing genotoxic endpoints such as sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations (Grillo et al., 2009). Prá et al. (2008) showed that the Copper induced mutagenicity as evaluated by the MN test in mice. The Cadmium (Cd) toxicity is well documented by several studies (Badisa et al., 2008; Casalino et al., 2006; Fatur et al., 2002; Giaginis et al., 2006; Koyuturk et al., 2007). Cd can lead to a process of carcinogenesis through various mechanisms of action as inhibition of DNA repair, induction of oxidative stress, aberrant gene expression and apoptosis resistance/inhibition (Joseph, 2009). Manganese (Mn) is reported to cause neurological disorders in excessive doses (Crossgrove and Zheng, 2004) and this can be explained by the fact that Mn can cause oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation (Milatovic et al., 2009). The toxicity of Lead (Pb) has been studied for many years throughout

several end-points but data related to the mutagenic, clastogenic and carcinogenic properties of lead and lead compounds is still conflicting, moreover biochemical and molecular mechanisms of action of lead remain still unclear (García-Léston et al., 2010). The Nickel is associated with some incidences of cancer and the carcinogenic actions of nickel compounds are thought to involve oxidative stress, genomic DNA damage, epigenetic effects, and the regulation of gene expression by activation of certain transcription factors related to corresponding signal transduction pathways (Lu et al., 2005).

Analyzing the data of raw water from Trad-MCN and CBMN assay, it can be observed that the Point 1 showed a highest MN average for both assays. This may be related to the fact that this point receives directly effluents from multiple sources, moreover the water from this point has no where to drain and possible concentrates a large number of genotoxins. Results for the genotoxicity on the water samples for both assays from dry season are relatively higher than that of the rainy season. This can be explained by the fact that in the rainy season occurs a decrease in the concentration of the contaminants due to the dilution factor (Brum and Netto, 2009). On the other hand, Point P2 showed the strongest response for both assays on the climates conditions. This may be due to the confluence area of this point, where there is a meeting of the tributaries rivers bringing a large amount of toxicants for the dam. The point P3 represented the water treated and distributed to the population. All the mutagenicity results for this point showed negative results, which was expected, except for Trad-MCN in dry season. This can be correlated with the presence of cadmium and copper above the limits of Brazilian legislation.

Comparing the mutagenic responses found in the Trad-MCN and CBMN assay in the different seasons for the raw water (Table 5), the two assays agree in 66, 66% of the responses. This data shows that the CBMN assay, which is well validated in worldwide, supports the majority responses found in the Trad-MCN, proving the importance and sensibility of the Trad-MCN to monitor the aquatic ecosystems. Obviously, differences

between the *in vitro* and *in vivo* bioassays may occur because the *in vitro* assays the cultures cells were directly exposed to damage, while in the *in vivo* assays the toxic compounds could be metabolized. In addition, the differences could also have been due to the difference in DNA damage responses by different cells types used in each assay (Jha et al., 2004; Caffetti et al., 2008). Furthermore, for the specific assay using a plant, it can be considered that the phytotoxicity from the metal absorbed by it is complex and depend of some factors such as the concentrations and speciation of the metal, the oxidation state of it, the concentration and duration of its exposure and the complex mechanisms of the hyperaccumulation (Patra et al., 2004; Yang et al., 2005).

The two kinds of micronuclei test used in this study, demonstrated the capacity of these water samples from Lucrecia dam to induce chromosome breakage and/or dysfunction of the mitotic apparatus. It is important to know that the aquatic environment is often the ultimate recipient of the increasing range of contaminants and because of this, the definition of the class of compounds responsible for the genotoxic contamination is difficult to know. Among the aspects to be considered are the effects of synergy and antagonisms that occur as a result of the mixture formed by a lot of chemical compounds and can be influenced by the local characteristics, and may be transported, transformed and/or bioaccumulated (Cesniene et al., 2010, Lemos et al., 2009). In the Lucrecia dam, it is clear that the heavy metals are persistent in this water and due to the mechanism of action they may be compromising the entire ecosystem, but probably are not the only genotoxics agents. There is a “cocktail” of environmental factors, such as radioactivity and toxic cyanobacteria as described by Marcon et al (2010) and possible others organic compounds in water, that taken together may be responsible for the mutagenic effects found for this water and may be endangering the health of all organisms, including human.

## **5. Conclusion**

All the results obtained in this study show the presence of genotoxic compounds, including heavy metals, in surface water in the Lucrecia dam which can induce chromosomal mutations and probably may be correlated with the high rate of cancer found in the population. These findings demonstrate the importance of using different organisms in genotoxicity assays in conjunction with analytical methods for the characterization of complex environmental mixtures. Further, a longer water quality monitoring is recommended to provide a better characterization of this public supply.

## **Aknowledgements**

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), the Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Norte (FAPERN) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

## References

- Alves NO, Loureiro ALM., Santos FC, Nascimento KH, Dallacort R, Vasconcellos PV, et al. Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2011; doi:10.1016/j.ecoenv.2011.04.007.
- Alves ES, Souza SR, Pedroso ANV, Domingos M. Potential of the Trad-MN assay applied with inflorescences of *Tradescantia pallida* “*purpurea*” for evaluating air contamination of naphthalene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2007; doi:10.1016/j.ecoenv.2007.09.006.
- Amaral VS, Silva RM, Reguly ML, Andrade HHR. Drosophila wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutation Research* 2005; 583, 67–74.
- APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC; 2005.
- Badisa VL, Latinwo LM, Odewumi CO, Ikediobi CO, Badisa RB, Brooks-Walter A, et al. Cytotoxicity and stress gene microarray analysis in cadmium-exposed CRL-1439 normal rat liver cells. *Int. J. Mol. Med* 2008; 22, 213–9.
- Barbosa JS, Cabral TM, Ferreira DN, Agnez-Lima LF, Batistuzzo de Medeiros SR. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2010; 73: 320–5.

- Bartoli KP, Azevedo MA, Silva LB. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutation Research* 2009; 675: 1-4.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et. al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; 28: 625–31.
- Brum DM, Netto ADP. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Tripuí River, Ouro Preto, MG. Brazil. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 165: 447-53.
- Caffeti JD, Mantovani MS, Pastori MC, Fenocchio AS. First Genotoxicity study of Paraná river water from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (Veneroida Corbiculidae) and Chinese hamster (*Cricetulus griseus* Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. *Genetic and Molecular Biology* 2008; 31: 561-5.
- Carreras HA, Pignata MI, Saldiva PHN. In situ monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MN) bioassay. *Atmospheric Environment* 2006; 40: 7824-30.
- Carvalho-Oliveira R, Pozo RMK, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Martins-Junior HA, Bustilho JOWV, et al. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. *Environmental Research* 2005; 98: 1-7

- Casalino E, Sblano C, Calzaretti G, Landriscina C. Acute cadmium intoxication induces alpha-class glutathione S-transferase protein synthesis and enzyme activity in rat liver. *Toxicology* 2006; 217, 240–5.
- Cesniene T, Kleizaite V, Ursache R, Zvingila D, Radzevicius A, Patamsyte J, et al. Soil-surface genotoxicity of military and urban territories in Lithuania, as revealed by *Tradescantia* bioassays. *Mutation Research* 2010; 697, 10–8.
- Conama (Conselho Nacional do Meio Ambiente), 2005. Resolução no. 357. Ministério do Meio Ambiente, MMA, Brasília, Distrito Federal. <<http://www.mma.gov.br/>> (accessed 05.06.2009).
- Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR in Biomedicine* 2004; 17: 544–53.
- DAnellakis A, Ntaikou I, Kornaros M, Dailanis S. Olive oil mill waste water toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 2011; 101: 358-66.
- Duan C-Q, Hu B, Wang Z-H, Wen C-H, Yan S-Q, Jiang X-H, Wang D-K, Li Q, Liang X-F. *Tradescantia* bioassays for the determination of genotoxicity of water in the Panlong River, Kunming, People's Republic of China. *Mutation Research* 1999; 426: 127-31.
- Egito LCM, Santos PC, Amaral VS, Medeiros SRB, Agnez-Lima LF. Use of native species *Crenicichla menezesi* (Ariidae) as a model for in situ evaluation of genotoxicity in surface water. *Science of the Total Environment* 2010; 408: 6042-6.

- El Asslouj J, Amahdar L, Glouib K, Kholtei S, El Amrani Paaza N, Verschaeve L, et al. *In vitro* genotoxicity of wastewaters from the town of settat, morocco. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009; 60: 289-96.
- Fatur T, Tusek M, Falnoga I, Scancar J, Lah TT, Filipic M. DNA damage and metallothionein synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposed to cadmium. *Food and Chemical Toxicology* 2002;. 40, 1069–76.
- Fenech M. Cytokinesis block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007; 2:1084-104.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 2000; 455: 81-95.
- Fenech M, Chang W P, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi E, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 2003; 534: 65–75.
- García-Lestón J, Méndez J, Pásaro E, Laffon B. Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environment International* 2010; 36, 623–36.
- GIAGINIS C, GATZIDOU E, THEOCHARIS S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 213, 282–90.
- Goyer RA, Liu J, Waalkes MP. Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals* 2004; 17: 555–8.

- Grillo CA, Reigosa MA, Mele MFL. Effects of copper ions released from metallic copper on CHO-K1 cells. *Mutation Research* 2009; 672, 45–50.
- Hashizume T, Yoshitomi S, Asahi S, Matsumura S, Chatani F, Oda M. *In vitro* micronucleus test in HepG2 transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms with chemicals requiring metabolic activation. *Mutation Research* 2009; 677: 1-7.
- Huang P, Huang B, Weng H, Nakayama K, Morimoto K. Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Preventive Medicine* 2009; 48: 383–8.
- Instituto Nacional do Câncer – INCA 2007. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. < <http://www.inca.gov.br/> > (accessed 20.7.2008).
- Jha AN. Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. *Mutation Research* 2004; 552: 1-17.
- Jiang S, Yu L, Cheng J, Leng S, Dai Y, Zhang Y, et al. Genomic damages in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms of three glutathione S-transferases in workers exposed to formaldehyde. *Mutation Research* 2010; 695: 9-15.
- Joseph P. Mechanisms of Cadmium Carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009; 238: 272-9.
- Knasmuller S, Uhl M, Gottmann CH, Majer BJ. The *Tradescantia* micronucleus bioassay, in: Maluszynska J, Plewa M. (Eds.), *Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health*. Katowice, Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego; 2002. p. 95-105.

- Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, Tunali S. The potential role of combined anti-oxidants against cadmium toxicity on liver of rats. *Toxicology and Industrial Health* 2007; 23, 393–401.
- Lemos CT, Rodel PM, Terra NR, Oliveira NCD, Erdtmann B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2007; 66: 391–401.
- Lemos AT, Rosa DP, Rocha JAV, Vargas VMF. Mutagenicity assessment in a river basin influenced by agricultural, urban and industrial sources. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; 72: 2058–65.
- Liu J, Dong M, Tang X, Sun X, Han X, Chen B, et al. Genotoxicity of water from the Songhua River, China, in 1994–1995 and 2002–2003: Potential risks for human health. *Environmental Pollution* 2009; 157: 357-64.
- Lu H, Shi X, Costa M, Huang C. Carcinogenic effect of nickel compounds. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 279: 45–67.
- Ma T-H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environmental Health Perspective* 1981; 37: 85-90.
- Majer BJ, Tschерko D, Paschke A, Wennrich R, Kundi M., Kandeler E, et al. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutation Research* 2002; 515: 111–24.

- Marcon AE, Ferreira DM, Moura MFV, Campos TFC, Amaral VS, Agnez-Lima LF, et al. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. *Chemosphere* 2010; in press.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006; 88, 1515-31.
- Meireles J, Rocha R, Neto AC, Cerqueira E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN). *Mutation Research* 2009; 675, 46–50.
- Mendiguchia C, Moreno C, Garcia-Vargas M. Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients. *Chemosphere* 2007; 69: 1509–17.
- Mielli AC, Matta MEM, Nersesyanc A, Saldiva PHN, Umbuzeiro GA. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutation Research* 2008; 672: 51-4.
- Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Gupta RC, Yu Y, Aschner M. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009; 240, 219–25.
- Misik M, Solenska M, Micieta K, Misikova K, Knasmuller S. In situ monitoring of clastogenicity of ambient air in Bratislava, Slovakia using the *Tradescantia* micronucleus assay and pollen abortion assays. *Mutation Research* 2006; 605: 1-6.

- Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, Rossi A M, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutation Research* 2008; 639: 27-34.
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research* 2004; 567: 109-49.
- Pereira TS, Rocha JAV, Ducatti A, Silveira GA, Pastoriza TF, Bringuenti L, et al. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in the state of Rio Grande do Sul. *Mutation Research* 2007; 629: 71-80.
- Prá D, Franke SIR, Giulian R, Yoneama ML, Dias JF, Erdtmann B, et al. Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. *Biometals* 2008; 21:289-97.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2010.
- Rodrigues GS, Ma T-H, Pimentel D, Weinstein LH. *Tradescantia* Bioassays as Monitoring Systems for Environmental Mutagenesis: A review. *Critical Reviews in Plant Sciences* 1997; 16: 325-59.
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 2004; 52, 199-223.

- Suyama F, Guimarães ET, Lobo DJA, Saldiva PHN. Pollen mother cells of *Tradescantia* Clone #4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-ray. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002; 35: 127–9.
- Steinkellner H, Kassie F, Knasmüller S. *Tradescantia*-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. *Mutation research* 1999; 426: 113–6.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry* 2005; 12: 1161-208.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico Biological Interactions* 2006; 160: 1–40.
- Vargas VMF, Migliavacca SB, Melo AC, Horn RC, Guidobono R, Ferreira ICFS, et al. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research* 2001; 490: 141-58.
- Villanueva CM, Grimalt JO, Malats N, Silverman D, Tardon A, et al. Bladder Cancer and Exposure to Water Disinfection By-Products through Ingestion, Bathing, Showering, and Swimming in Pools. *American Journal of Epidemiology* 2007; 165: 148-156.
- Wang Q, Ji F, Sun Y, Qui Y, Wang W, Wu F, et al. Genetic polymorphisms of XRCC1, HOGG1 and MGMT and micronucleus occurrence in Chinese vinyl chloride-exposed workers. *Carcinogenesis* 2010; 31: 1068-73.

Wnuk M, Lewinska A, Oklejewicz B, Bugno M, Slota E, Bartosz G. Evaluation of the cyto and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes in vitro. *Mutation Research* 2009; 679, 18–23.

World Health Organization, 2003. Chemical Hazards in Drinking Water. Available from:<  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/en/index.html)>.

Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2005; 18, 339–53.

Zhang X, Zhang B, Zhang X, Chen F, Zhang J, Liang S, et al. Research and control of well water pollution in high esophageal cancer areas. *World Journal of Gastroenterology* 2003; 9: 1187-90.

## Figure Legends

**Figure 1.** Location of the Lucrecia dam study area in semi-arid region of Rio Grande do Norte – Brazil and the collection sites points.

**Table 1.** Physicochemical characterization of water samples collected from Lucrecia dam.

Season	Parameter	Sample Point		
		P1	P2	P3
<b>Dry</b>	pH	8.00	8.00	8.70
	Turbidity, NTU	3.33	3.33	0.10
	Total floating solids, mg/L	273.60	261.00	230.00
	NH <sub>3</sub> , mg/L	0.24	0.04	0.03
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , mg/L	0.00	0.00	0.00
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mg/L	0.00	0.00	0.00
<b>Rainy</b>	pH	7.07	7.46	7.77
	Turbidity, NTU	6.72	9.50	0.57
	Total floating solids, mg/L	207.80	208.30	207.70
	NH <sub>3</sub> , mg/L	0.43	0.07	0.10
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , mg/L	0.00	0.00	0.00
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mg/L	0.00	0.00	0.02

NTU is Nephelometric Turbidity Unit

**Table 2.** Concentrations (mg/L) of the metals measured in the water samples from different points at the Lucrecia dam and the maximum allowed values by CONAMA and WHO.

Season	Metal	CONAMA (A)	WHO	Sample Points (mg/L)		
				P1	P2	P3
Dry	Cd	0.001	0.003	0.004 <sup>a,b</sup>	0.004 <sup>a,b</sup>	0.003 <sup>a</sup>
	Pb	0.010	0.010	0.007	0.005	0.003
	Zn	0.180	3.000	0.006	0.020	0.008
	Cr	0.005	0.050	0.004	0.004	0.005
	Cu	0.009	1.000	0.349 <sup>a</sup>	0.005	0.031 <sup>a</sup>
	Ni	0.025	0.020	0.003	0.005	0.003
	Mn	0.100	0.100	0.079	0.067	0.007
Rainy	Cd	0.001	0.003	0.000	0.005 <sup>a,b</sup>	0.000
	Pb	0.010	0.010	0.050 <sup>a,b</sup>	0.000	0.000
	Zn	0.180	3.000	0.015	0.000	0.010
	Cr	0.005	0.050	0.000	0.000	0.000
	Cu	0.009	1.000	0.000	0.000	0.000
	Ni	0.025	0.020	0.000	0.050 <sup>a,b</sup>	0.000
	Mn	0.100	0.100	0.195 <sup>a,b</sup>	0.105 <sup>a,b</sup>	0.000

(A) Maximum values allowed by Brazilian legislation – resolution 357/2005 of the National Council of the Environment (CONAMA)

(B) Maximum values allowed according Chemical Hazards in Drinking Water of World Health Organization (WHO, 2003)

<sup>a</sup> Value above the allowed limit according to CONAMA, 2005

<sup>b</sup> Value above the allowed limit according WHO, 2003

**Table 3.** Frequency of micronuclei (MN%  $\pm$  S.D) obtained for *T. pallida* exposed to different points of the raw water samples from the Lucrecia dam.

Season	Sample Points		
	P1	P2	P3
Dry	4,23 $\pm$ 1,11**	3,49 $\pm$ 0,59**	2,79 $\pm$ 0,75**
Rainy	2,43 $\pm$ 0,95	2,66 $\pm$ 0,80**	1,50 $\pm$ 0,36

Negative Control: 1,46  $\pm$  0,76; Positive Control: 4,25  $\pm$  0,86\*\*\*

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Statistically significant compare to negative control according to ANOVA.

**Table 4.** Frequency of micronuclei in human lymphocytes and N.D.I. by different dilutions of the water samples from different points at the Lucrecia dam.

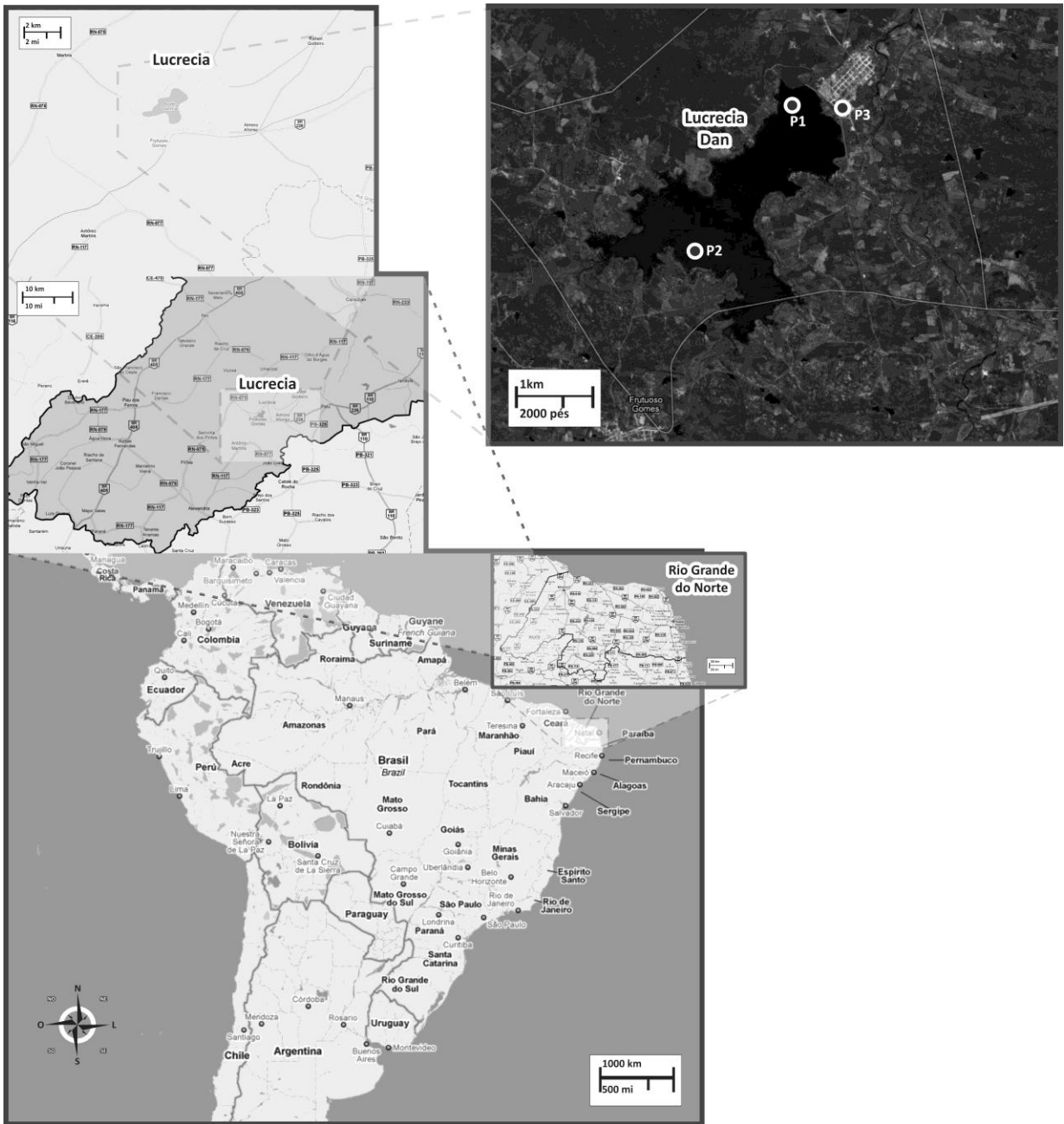
Season	Dilution	Sample Points					
		P1		P2		P3	
		MN% ± S.D.	NDI	MN% ± S.D.	NDI	MN% ± S.D.	NDI
Dry	Raw water	15,00 ± 2,00**	1,961	11,00 ± 2,64**	2,004	6,67 ± 1,53	1,979
	50% diluted	8,33 ± 1,53*	1,972	8,00 ± 1,53*	2,022	5,67 ± 1,53	1,970
	25% diluted	7,33 ± 1,15*	1,922	5,67 ± 1,53	1,973	5,67 ± 0,58	2,001
Rainy	Raw water	12,67 ± 2,31**	1,989	8,67 ± 1,53**	1,930	7,00 ± 2,00	1,997
	50% diluted	6,67 ± 2,08	2,000	6,33 ± 2,31	1,959	5,33 ± 1,15	2,010
	25% diluted	6,33 ± 0,58	2,005	5,67 ± 1,15	1,960	6,00 ± 1,00	1,988

Negative Control: 5,33 ± 0,57; NDI= 2,065 Positive Control: 41,33 ± 4,04\*\*\*; NDI=1,821\*  
 NDI: Nuclear Division Index. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Statistically significant compared to negative control according to Kruskal – Wallis Test.

**Table 5.** Mutagenic response obtained by both micronucleus assays for raw water from Lucrecia dam.

Sample Points Raw Water		Mutagenicity assays	
		Trad-MN	CBMN
Dry Season	P1	+	+
	P2	+	+
	P3	+	-
Rainy Season	P1	-	+
	P2	+	+
	P3	-	-

+ Positive results, - Negative results.



Garcia et al. Figure 1

## CONCLUSÕES GERAIS

O conjunto dos resultados obtidos nesse trabalho demonstra a presença de compostos genotóxicos nas águas superficiais do Açude de Lucrécia, capazes de induzir mutações cromossômicas nos testes realizados, e que podem estar correlacionados com o alto índice de câncer encontrado na população. Além disso, é importante frisar a importância do Radônio nesta região, que apesar de não ter sido alvo desse estudo, também pode ser um fator de risco, atuando sinergicamente com os contaminantes encontrados. Esses achados demonstram a importância da utilização de diferentes ensaios de genotoxicidade na caracterização de misturas ambientais complexas, associados a métodos analíticos que fornecem informações sobre as concentrações dos químicos presentes no ambiente sobre os sistemas biológicos.

Diante da importância desse corpo aquático para sua região de abrangência e da crescente necessidade de fontes de águas apropriadas para o consumo humano, indústria e agricultura, se faz necessário a elaboração de um programa periódico de avaliação da qualidade de suas águas, levando em consideração não apenas os parâmetros químicos como também as análises de genotoxicidade. Estudos adicionais também devem ser realizados, utilizando outras metodologias, para detecção de outros tipos de poluentes e seus efeitos sobre a biota, como também para uma melhor caracterização e compreensão dos processos genético-moleculares envolvidos na genotoxicidade observada.

Além desse aspecto, foi possível verificar também o grande interesse dos moradores de Lucrécia com relação aos aspectos ambientais e ainda, a forte ligação que eles apresentam com o açude da região não só no seu imaginário, mas também na utilização da água para múltiplos fins. Entretanto, apesar desses laços topofílicos criados, isso não impede que muitos dos moradores percebam os riscos que essa água possa apresentar. Dessa forma, isso remete a necessidade constante de, não apenas monitorar este açude, como também, de estar em contato com essa população esclarecendo e contribuindo para melhores práticas ambientais, levando em conta a necessidade local. Assim, futuros projetos de educação ambiental a partir dos dados obtidos neste trabalho, no qual práticas como a divulgação científica sejam realizadas, figurar-se-ão, como ferramentas educativas primordiais para a população de Lucrécia.

Logo, torna-se fundamental unir os esforços científicos aos do Governo, na sua esfera educacional, ambiental e de saúde pública, de forma a realizar ações integradas em prol do melhor desenvolvimento e qualidade de vida no município de Lucrécia.

## **APÊNDICES**

APÊNDICE A- Questionário aplicado de Percepção Ambiental



**QUESTIONÁRIO PERCEPÇÃO AMBIENTAL/ LUCRÉCIA**

**ATENÇÃO:** Leia atentamente as questões e marque com um X sua resposta.  
 Nas questões 5, 7 e 13, podem ser marcadas mais de 1 opção.

- 1. Sexo:** ( ) Feminino ( ) Masculino
- 2. Idade:** ( ) 18-20 ( ) 41-50  
 ( ) 21-30 ( ) 51-60  
 ( ) 31-40 ( ) Acima de 60
- 3. Tempo de Residência na Cidade:**  
 ( ) Menos de 1 ano ( ) Entre 1 a 5 anos  
 ( ) Entre 5 e 10 anos ( ) Mais de 10 anos
- 4. Escolaridade:**  
 ( ) Sem escolaridade  
 ( ) 1º grau incompleto  
 ( ) 1º grau completo  
 ( ) 2º grau incompleto  
 ( ) 2º grau completo  
 ( ) superior incompleto  
 ( ) superior completo
- 5. Para você, o que faz parte do meio ambiente?**  
 ( ) Rios, lagos e mares  
 ( ) Os animais  
 ( ) Pessoas  
 ( ) Árvores, plantas  
 ( ) Praças, parques, casas, prédios  
 ( ) Ar, céu  
 ( ) Ruas, calçadas, estradas  
 ( ) Todas as alternativas estão corretas
- 6. Você se preocupa com o meio ambiente?**  
 ( ) Sim ( ) As vezes ( ) Não ( ) Nunca
- 7. Você tem informações sobre o meio ambiente através de:**  
 ( ) Livros ( ) Rádio  
 ( ) Jornais ( ) Aulas/Escola  
 ( ) Revistas ( ) Internet  
 ( ) Televisão
- 8. Você acha que existem problemas ambientais na sua cidade?**  
 ( ) Muitos ( ) Poucos ( ) Nenhum ( ) Não sei
- 9. Cite 2 desses problemas, caso você acha que exista:**  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_
- 10. No seu dia-a-dia você considera que causa algum prejuízo ao meio ambiente?**  
 ( ) Muitos ( ) Poucos ( ) Nenhum ( ) Não sei
- 11. Qual o seu nível de satisfação com o meio ambiente do seu município:**  
 ( ) Excelente ( ) Ótimo ( ) Bom ( ) Ruim  
 ( ) Péssimo
- 12. Com relação ao açude da cidade, como você o utiliza?**  
 ( ) Bebe água diretamente  
 ( ) Pesca  
 ( ) Toma banho  
 ( ) Utiliza nas atividades domésticas (lavar pratos, cozinhar, etc...)  
 ( ) Evita utilizar a água dele  
 ( ) Não utiliza para nada
- 13. Como você considera a qualidade da água do açude do seu município?**  
 ( ) Ótima ( ) Boa ( ) Regular  
 ( ) Ruim ( ) Péssima ( ) Não sei
- 14. Você acha que a água do açude pode prejudicar a sua saúde?**  
 ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- 15. Você conseguiria imaginar o seu município sem o açude?**  
 ( ) Sim ( ) Não ( ) Nunca pensei
- 16. Descreva o que o açude de Lucrécia representa para você.**  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B- Aprovação da aplicação dos questionários no Comitê de Ética UFRN



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

### PARECER N° 072/2010

<b>Prot. nº</b>	003/10 CEP/UFRN	
<b>CAAE</b>	0004.0.051.000-10	
<b>Projeto de Pesquisa</b>	Percepção ambiental dos moradores do município de Lucrécia/RN	
<b>Área de Conhecimento</b>	2 - CIÊNCIAS BIOLÓGICAS 2.01 - Biologia Geral	Grupo III
<b>Pesquisador Responsável</b>	Anuska Conde Fagundes Soares Garcia	
<b>Instituição Onde Será Realizado</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN	
<b>Instituição Sediadora</b>	Município de Lucrécia/RN	
<b>Nível de abrangência do Projeto</b>	Dissertação de Mestrado	
<b>Período de realização</b>	Cronograma: Início - abr/2010 - Término - fev/2011 Arrolamento: Início - mai/2010 - Término mai/2010	
<b>Revisão ética em</b>	7 de maio de 2010	

### RELATO

#### 1. RESUMO

O protocolo em análise refere-se a um desdobramento do projeto de pesquisa intitulado "Avaliação genotóxica da água do açude de Lucrécia: um enfoque na relação ambiente e saúde" aprovado sob o protocolo número 072/07 pelo CEP da UFRN. O projeto atual intitulado "Percepção ambiental dos moradores do município de Lucrécia/RN" tem por objetivo investigar como os moradores do município de Lucrécia/RN percebem o meio ambiente onde vivem. Objetiva-se também avaliar o conhecimento básico da população sobre o meio ambiente e as fontes de informação mais usuais, assim como utilizam o açude de sua cidade.

É importante destacar que o referido açude vem apresentando problemas de contaminação por cianobactérias e metais pesados, impondo riscos à saúde dessa população. A hipótese levantada pelo estudo é que as pessoas não possuem conhecimento suficiente acerca do meio ambiente que as rodeia, como por exemplo, da consequência do uso da água do açude Lucrecia. A literatura tem apontado uma prevalência duas vezes superior nos municípios que utilizam a água desse açude comparada com a prevalência do Estado do Rio Grande do Norte, principalmente em relação ao câncer nas vias gástricas. A literatura aponta também que projetos de pesquisa sobre percepção ambiental contribuem à reflexão e entendimento de uma dada população acerca de suas ações no ambiente, contribuindo a uma utilização mais racional dos recursos naturais. Além do mais, possibilita a participação da comunidade no desenvolvimento e planejamento regional, proporcionando uma interação harmônica do conhecimento da população local com o conhecimento científico enquanto instrumento educativo e de transformação. Assim sendo, os investigadores esperam que os resultados finais da pesquisa contribuam à sensibilização da população sobre os riscos causados pelo consumo de água do açude e que se transformem em atores de propagação desse conhecimento. Espera-se ainda que os resultados aportados contribuam na melhoria da saúde local, alertando os órgãos competentes para a problemática existente, e dessa forma, se possam formar parcerias em diversos níveis para trazer melhorias ao município de Lucrecia/RN.

A amostra objeto de estudo será composta por 100 moradores do município de Lucrecia/RN, selecionados por amostragem aleatória probabilística. O critério de inclusão é que sejam maiores de 18 anos, de qualquer etnia racial, grupo e classe social. O instrumento utilizado é um questionário elaborado a partir de levantamento bibliográfico sobre a temática que visa contemplar informações sobre: o entrevistado, seu conhecimento sobre meio ambiente e questões relativas ao açude de Lucrecia.

*Julia*

**2. ENTENDIMENTOS E PARECER**

Considerando que as pendências expostas por este Comitê foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

**3. ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR**

Em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em pesquisa (Brasília, 2002) e Res. 196/96 – CNS o pesquisador deve:

1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Res. 196/96 CNS – item IV.2d);
2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Res. 196/96 – CNS item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p. 41);
4. apresentar ao CEP/UFRN relatório final após conclusão da pesquisa (Manual Operacional para Comitês de ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.65).

Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN ([www.etica.ufrn.br](http://www.etica.ufrn.br)).

Natal, 10 de maio de 2010.

  
Dulce Almeida

Coordenadora do CEP-UFRN

## APÊNDICE C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Prezado Participante,

Este é um convite para você participar da pesquisa **PERCEPÇÃO AMBIENTAL DOS MORADORES DO MUNICÍPIO DE LUCRÉCIA/ RN** que é coordenada pelas Professoras da UFRN: Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros e Viviane Souza do Amaral, pela mestranda responsável Anuska Conde Fagundes Soares Garcia e pelo doutorando Alexandre Endres Marcon.

Essa pesquisa tem como objetivo principal avaliar a compreensão dos moradores do município de Lucrécia/RN sobre o meio ambiente em que vivem, incluindo a utilização do aqúde da cidade. Esta pesquisa é muito importante, pois o aqúde de Lucrécia vem recebendo grandes quantidades de poluentes tanto de origem humana quanto natural, os quais podem impor sérios riscos a população que se utiliza dele para os diversos fins. Assim, o questionário funcionará como uma forma de se conhecer a situação dessa comunidade em relação ao seu saber/agir ambiental e, além disso, pode tornar-se parte fundamental para futuros projetos de educação ambiental, já que através deste questionário, será possível identificar as necessidades, as expectativas e as relações que os moradores de Lucrécia estabelecem com o meio ambiente da sua localidade.

Caso decida aceitar o convite, sua participação envolverá uma entrevista com a duração aproximada de 10 min. A sua participação é voluntária e se você decidir não participar, quiser desistir de continuar em qualquer momento, ou ainda, se recusar a responder qualquer pergunta que ocasione algum constrangimento, tem absoluta liberdade em fazê-lo.

Os riscos em participar dessa pesquisa são considerados mínimos. Como benefício, destaca-se a participação direta dos moradores locais que irão contribuir nos ajudando na preparação desses registros, os quais representarão a realidade de como a comunidade compreende o ambiente em que vive e como o utilizam. Dessa forma, projetos futuros de educação ambiental poderão ser implantados levando em conta as necessidades locais analisadas através questionário.

Em todas as etapas dessa pesquisa, inclusive na publicação dos resultados, sua identidade será mantida em sigilo e serão omitidas todas as informações que permitam identificá-lo (a).

Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação nesta pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo (TCLE) e toda a dúvida que você tenha a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para a mestranda: Anuska Conde Fagundes Soares Garcia, no telefone (84) 9150-5363 ou pelo email [anuska\\_garcia@hotmail.com](mailto:anuska_garcia@hotmail.com).

Dúvidas a respeito da Ética desta Pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN no endereço: Campus Universitário, Av. Senador Salgado Filho, s/n, bairro: Lagoa Nova, Natal, 59078-970, e-mail [cepufn@reitoria.ufrn.br](mailto:cepufn@reitoria.ufrn.br) ou pelo telefone: (84) 3215-3135.

Atenciosamente,

\_\_\_\_\_  
Anuska Conde Fagundes Soares Garcia  
Mestranda/Pesquisadora

**Consinto em participar desta pesquisa e declaro ter recebido uma cópia deste termo de consentimento.**

Participante

Nome: \_\_\_\_\_ ; idade: \_\_\_\_\_ ;

Sexo: \_\_\_\_\_.

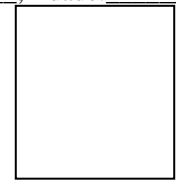
Assinatura do participante: \_\_\_\_\_.

Pesquisador Responsável:

Nome: Anuska Conde Fagundes Soares Garcia

Assinatura do responsável pela pesquisa: \_\_\_\_\_.

Cidade: \_\_\_\_\_, Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.



Aposição da Digital

**APÊNDICE D- Fotografias do Açude de Lucrécia**

**A:** Visão Geral do Açude de Lucrécia. **B e C:** Pontos amostrais P1 e P2, respectivamente, no período de seca (Novembro/ 2009). **D e E:** Pontos amostrais P1 e P2, respectivamente, no período chuvoso (Maio/ 2010). **FOTOS:** Anuska Garcia.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### Normas de publicação na revista Educação Ambiental em Ação

#### Como colaborar - Normas de publicação na Educação Ambiental em Ação

##### 1. Apresentação

Aos interessados em colaborar com esta publicação enviando contribuições, esclarecemos que a revista eletrônica Educação Ambiental em Ação nasceu a partir do Grupo de Educação Ambiental da Internet – GEAI, em 2002. É **editada trimestralmente** e é mantida pelo esforço voluntário de cada membro da equipe, principalmente seus editores, não tendo uma instituição mantenedora. Esta publicação é totalmente feita com os recursos da internet e não possui versão impressa. Todos os volumes anteriores estão à disposição no ambiente virtual. A revista pretende ser **instrumento para divulgar, difundir e incentivar ações de Educação Ambiental integradas e conscientizadoras em todos os espaços sociais que estejam dentro dos eixos temáticos** descritos abaixo. Pretende mostrar o que muitas pessoas, de diferentes Estados do Brasil, e alguns estrangeiros, pensam e fazem para a consolidação da Educação Ambiental. Por fim, pretende ser um jardim de idéias, um solo fértil onde germinam sementes de conscientização, ação, reflexão, tolerância e confiança na construção de um mundo melhor.

**Editores responsáveis:** Berenice Gehlen Adams, Sandra Barbosa e Júlio Trevisan

**Endereço eletrônico:** [www.revistaea.org](http://www.revistaea.org)

##### 2. Normas de publicação

###### 2.1 Eixos temáticos

A revista eletrônica Educação Ambiental em Ação publica trabalhos que estejam relacionados com os eixos temáticos a seguir, desde que seguidas as normas aqui expostas:

- Relatos de Práticas de Educação Ambiental;
- Diversidade da Educação Ambiental;
- Educação Ambiental e Seus Contextos;
- Educação Ambiental e Cidadania;
- Sensibilização e Educação Ambiental;
- Reflexões para Conscientização.

###### 2.2 Processo de publicação

**2.2.1** Serão aceitos somente trabalhos para publicação em **português**. Todo trabalho enviado deve antes ser cuidadosamente revisado a adequado às instruções contidas nas seções 2.3 e 2.4.

**2.2.2** Os autores são os únicos responsáveis pelas idéias expostas em seus trabalhos, como também pela responsabilidade técnica e veracidade das informações, dados etc, apresentados. Os editores não se responsabilizam pelo conteúdo dos textos publicados.

**2.2.3** Os autores estarão cedendo os direitos autorais à revista, sem quaisquer ônus para esta, considerando seu caráter de fins não lucrativos.

**2.2.4 O Trabalho deve ser enviado para sicologia “arrobat” yahoo.com.br conforme seções 2.3 e 2.4.** Favor escrever “ARTIGO Revista EA (título)” como assunto da mensagem eletrônica.

**2.2.5.** Inicialmente, será verificado se o trabalho está inserido em um ou mais dos eixos temáticos listados na seção 2.1. Caso contrário, o trabalho será rejeitado sem possibilidade de re-envio.

**2.2.6** Será verificado se o documento está formatado conforme as normas descritas na seção 2.4. Caso contrário, será solicitado ao autor o envio de uma nova versão que observe as normas de formatação.

**2.2.7** Se o documento atender aos critérios 2.2.5 e 2.2.6, será submetido ao corpo revisor da revista. Nesta etapa, o trabalho será lido pelos revisores, os quais emitirão pareceres segundo a lista abaixo:

- (A) Trabalho deve ser aceito sem correções
- (B) Trabalho deve ser aceito mediante correções
- (C) Conteúdo inadequado para publicação

No caso de o trabalho ser aceito mediante correções (parecer B), o autor correspondente receberá uma resposta contendo a lista das correções a serem feitas. Cabe ao autor elaborar uma nova versão do documento e re-iniciar o processo de submissão a partir do item 2.2.4 acima.

**2.2.8** O tempo entre submissão e publicação do artigo pode variar de 3 a 6 meses. Tipicamente, são publicados em cada edição no máximo dez trabalhos. Os trabalhos serão analisados na ordem em que foram enviados aos editores, havendo portanto uma lista de espera.

**2.2.9** Não há qualquer responsabilidade por parte dos editores em fornecer atestados de recebimento de artigos ou de publicação tendo em vista ser um trabalho desenvolvido de forma totalmente voluntária, sem objetivos financeiros ou promocionais. Trata-se, portanto, de um projeto experimental que tem dado importante contribuição para a implementação da Educação Ambiental.

## **2.3 Estrutura do documento**

### **2.3.1 Tipos de documentos aceitos**

Os artigos podem ser submetidos em um dos seguintes formatos: DOC (Word 2003-), DOCX (Word 2007), RTF, ou ODT (OpenOffice)

### **2.3.2 Extensão do texto**

A extensão do trabalho deverá ser de no **máximo 5000 palavras**.

### **2.3.3 Nome do arquivo**

O nome do arquivo de envio deve conter parte do título, sem acentos ou caracteres especiais.

### 2.3.4 Folha-de-rosto

A primeira página do documento deve conter uma “folha-de-rosto” contendo as seguintes informações: título; autores; instituição; e-mail para contato.

### 2.3.3 Conteúdo

A organização do trabalho deve respeitar a seqüência abaixo

- Título;
- Informações sobre os autores: título acadêmico; nome; referência profissional; endereços para correspondência, telefones, fax e e-mail;
- Resumo;
- Texto completo;
- Referências bibliográficas.

## 2.4 Formatação

### 2.4.1 Texto

A revista possui certa flexibilidade quanto à formatação do texto. Porém, a formatação deve ser consistente, ou seja, o padrão de formatação adotado para cada elemento do texto (título de seção, corpo, legenda de figura etc) deve ser mantido em todo o documento. O padrão de formatação inclui:

- estilos de letras (efeito, tamanho etc);
- estilos de parágrafos (alinhamento, espaçamento entre linhas, recuo, espaço antes e depois etc)

Para o corpo principal do texto, utilizar *font Arial*, tamanho **12**.

Para o corpo principal do texto, utilizar **espaçamento de parágrafo simples**.

### 2.4.2 Figuras

**2.4.2.1** Figuras devem ser geradas, salvas como imagem, e depois inseridas no documento principal. Imagens devem ser geradas no tamanho que proporcione a clareza desejada quando visualizadas em escala (zoom) 100%, porém, larguras devem ser no máximo 960 pixels.

**2.4.2.2** Não é permitido o uso de caixas de texto, molduras, objetos de desenho (retângulos, setas etc) ou qualquer outro recurso de desenho. Não é permitido inserir qualquer objeto no documento (por exemplo, gráficos do Excel), exceção feita a equações. Para gerar figuras contendo anotações, diagramas etc, utilize um programa externo (por exemplo, (Photoshop), Powerpoint) e salve a figura como imagem.

**2.4.2.3** Cada figura deve ser mencionada pelo menos uma vez no texto. Figuras devem ter uma legenda abaixo, explicando a figura detalhadamente, sem que o leitor tenha que remeter ao texto principal para entender pontos-chave das figuras.

### **2.4.3 Referências bibliográficas**

A revista é flexível quanto às normas para referências bibliográficas a serem adotadas pelos autores. Porém, o padrão adotado deve ser claro e mantido ao longo do texto. No entanto, recomenda-se adoção das normas ABNT.

Atenciosamente,

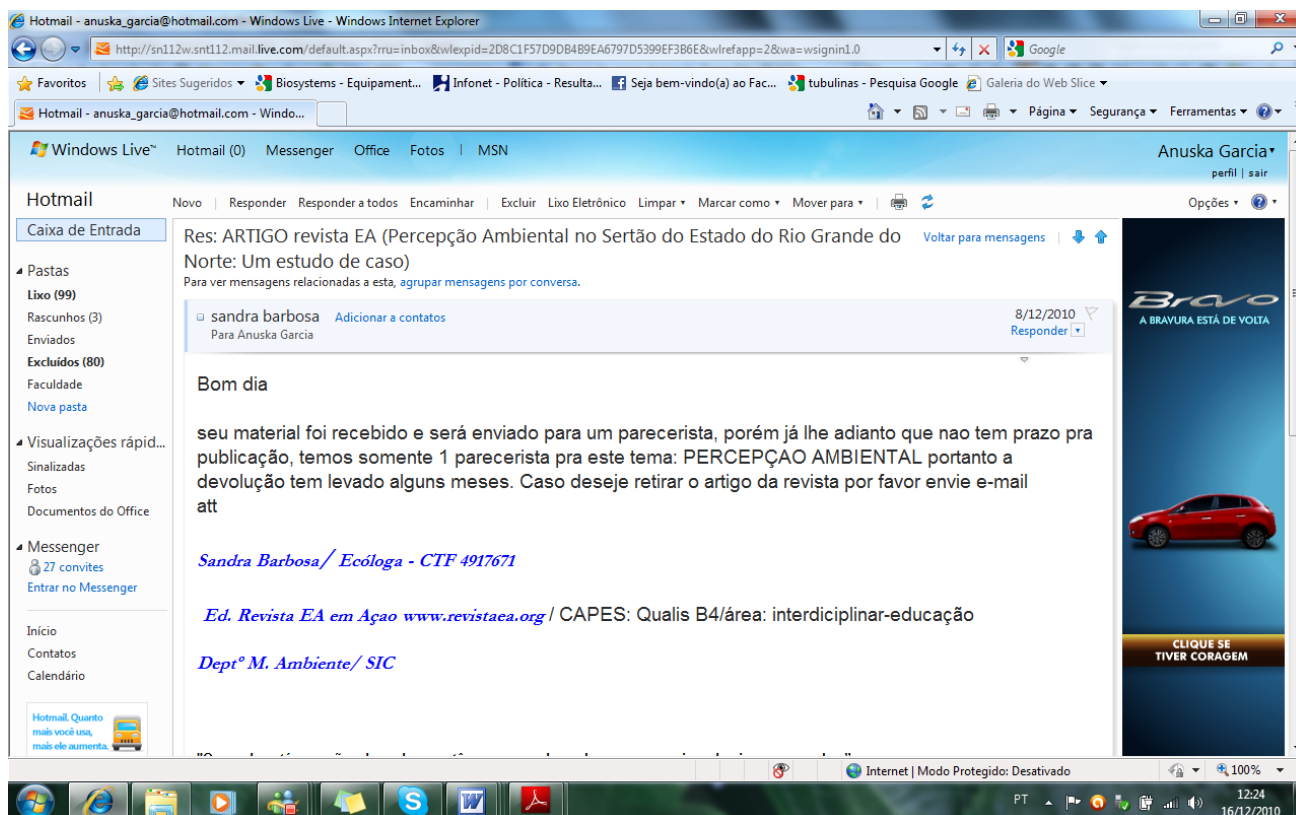
Berenice Adams, Júlio Trevisan e Sandra Barbosa

Editores responsáveis e equipe da Educação Ambiental em Ação.

*Normas atualizadas em Dezembro de 2010.*

## ANEXO B- Comprovante de submissão do artigo

Devido a essa revista ser de cunho totalmente voluntário, os editores não enviam atestado de submissão (como está descrito em 2.2.9 nas normas de publicação, anexo A). Assim, usarei a confirmação do recebimento pelo e-mail, como uma forma de comprovação.



## ANEXO C- Normas da revista Science of Total Environment

### SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT

An International Journal for Scientific Research into the Environment and its Relationship with Humankind

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Author	p.4

ISSN: 0048-9697

### DESCRIPTION

The journal is an international medium for publication of original research on the environment with emphasis on changes caused by human activities. It is concerned with changes in the natural levels and distribution of chemical elements and their compounds that may affect the well-being of the living world, or represent a threat to human health. Papers in applied environmental chemistry and environmental health sciences are particularly encouraged. The scope is multidisciplinary and international and the subjects covered include:

- (a) all aspects of the contamination or pollution of air, water, soil and the human food chain;
- (b) natural and human-induced environmental changes at the global, regional and local levels;
- (c) environmental risk management, remediation & treatment and environmental policy appraisal;
- (d) effects on human and ecosystem health related to abnormalities in the level and distribution of chemical elements and their compounds in the environment;
- (e) novel techniques and methods of chemistry and biochemistry applicable to environmental problems and environmental health;
- (f) gene-environment interactions.

**Special Issues** consist of a collection of papers on a particular subject that reflect current thinking and awareness in a field that involves cutting edge science. These Issues should be focused on emerging or pressing environmental issues of scientific or public concern with global or regional significance.

A Special Issue can contain review papers, original research articles or a combination of the two. A Special Issue should provide a reasonable assessment of what is new, what is current, what needs to be known or what should be done on a particular topic. Intending authors should first consult with the Associate Editor for Special Issues or the Editor-in-Chief before preparing their manuscripts.

### AUDIENCE

Environmental Scientists, Environmental Toxicologists, Ecologists, Chemical/Environmental Engineers, Environmental Health Scientists and Epidemiologists, Risk Scientists, Environmental Science Managers and Administrators.

### IMPACT FACTOR

2009: 2.905 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2010

## ABSTRACTING AND INDEXING

Biology & Environmental Sciences  
 CSA Technology Research Database  
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences  
 EMBASE  
 Elsevier BIOBASE  
 Environmental Periodicals Bibliography  
 MEDLINE®  
 Meteorological and Geostrophysical Abstracts  
 Oceanographic Literature Review  
 PASCAL/CNRS  
 Scopus  
 Selected Water Resources Abstracts  
 Sociedad Iberoamericana de Informacion Cientifica (SIIC) Data Bases

## EDITORIAL BOARD

### *Editor-in-Chief*

**J.O. Nriagu**, Dept. of Environmental &, Industrial Health, University of Michigan, 109 Observatory St, Ann Arbor, MI 48109-2029, USA, Fax: 001 734 615 7141, **Email:** stoten@umich.edu

### *Executive Editor*

**J.G. Farmer**, School of Geosciences, Crew Building, University of Edinburgh, West Mains Road, Edinburgh, EH9 3JN, UK, Fax: +44 131 662 0478, **Email:** stoten@ed.ac.uk

### *Associate Editors*

**J.P. Bennett**, Dept. of Botany, University of Wisconsin at Madison, 430 Lincoln Dr, Madison, WI 53706, USA, Fax: 001 608 265 2993, **Email:** jpbennet@wisc.edu

**B.W. Brooks**, Dept. of Environmental Science, Inst. of Biomedical Studies, Ctr. for Reservoir and Aquatic Systems Research, Baylor University, One Bear Place # 97266, Waco, TX 76798-7266, USA, Fax: +1 254 710 3409, **Email:** bryan\_brooks@baylor.edu

**L. George**, Environmental Sciences and Resources Program, Portland State University, P.O. Box 751, Portland, OR 97207, USA, Fax: +1 503 725 3888, **Email:** georgeL@pdx.edu

**C.P. Huang**, Dept. of Civil and Environmental Engineering, University of Delaware, 360 D Dupont Hall, Newark, DE 19716, USA, **Email:** huang@ce.udel.edu

**A.B. MacKenzie**, Scottish Universities Environmental Research Centre (SUERC), Rankine Ave, Scottish Enterprise Technology Park, East Kilbride, G75 0QF, UK, Fax: +44 (0) 1355 229898, **Email:** A.MacKenzie@suerc.gla.ac.uk

**L. Morawska**, School of Physical and Chemical Sciences, International Laboratory for Air Quality and Health, Queensland University of Technology, 2 George Street, Brisbane, Q 4001, Australia, Fax: +61 7 3864 9079, **Email:** l.morawska@qut.edu.au

**S.J.T. Pollard**, Integrated Waste Management Centre, Cranfield University, School of Applied Sciences Building 61 College Roa, Cranfield, Bedford, MK43 0AL, UK, Fax: +44 1234 751 671, **Email:** s.pollard@cranfield.ac.uk

**F. Rigét**, Natl. Environmental Research Institute, Aarhus University, Frederiksborgvej 399, DK-4000 Roskilde, Denmark, Fax: +45 46301914, **Email:** ffr@dmu.dk

**I. Snape**, Australian Antarctic Division, Environmental Protection and Change Program, 230 Channel Highway, Kingston, TAS 7050, Australia, Fax: +61 3 6232 3158, **Email:** ian.snape@aad.gov.au

**C.E.W. Steinberg**, Inst. of Biology; Freshwater and Stress Ecology, Humboldt- Universität Berlin, Arboretum, Späthstr. 80/81, 12437 Berlin, Germany, Fax: +49 (0)30 6369 446, **Email:** christian\_ew\_steinberg@web.de

### *Assistant Editor*

**M.C. Livingston**, Dept. of Environmental Health Sciences, School of Public Health, University of Michigan, 109 S. Observatory Street, MI 48109-2029 Ann Arbor,, **Email:** stoten@umich.edu

### *Editorial Board*

**B. Ahman**, Uppsala, Sweden, **Email:** birgitta.ahman@hgen.slu.se

**R. Bargagli**, Siena, Italy, **Email:** bargagli@unisi.it

**J. Burger**, Piscataway, NJ, USA, **Email:** burger@biology.rutgers.edu

**J.N. Cape**, Penicuik, UK, **Email:** jnc@ceh.ac.uk

**L.H.M. Chan**, Prince George, BC, Canada, **Email:** lchan@unbc.ca

**M. Cresser**, York, UK, **Email:** msc5@york.ac.uk

**A. Cundy**, Brighton, UK, **Email:** A.Cundy@brighton.ac.uk

**J. Dorea**, Brasilia, Brazil, **Email:** dorea@rudah.com.br

**L.K. Duffy**, Fairbanks, AK, USA, **Email:** FYCHEM@UAF.EDU

**X. Feng**, Guiyang, China, **Email:** fengxinbin@vip.skleg.cn

**A. Frank**, Uppsala, Sweden, **Email:** dr.a.frank@rocketmail.com  
**M. Graham**, Edinburgh, UK, **Email:** Margaret.Graham@ed.ac.uk  
**J.O. Grimalt**, Barcelona, Spain, **Email:** JGOQAM@CID.CSIC.ES  
**B.L. Gulson**, Sydney, NSW, Australia, **Email:** bgulson@gse.mq.edu.au  
**M.S. Gustin**, Reno, NV, USA, **Email:** msg@unr.nevada.edu  
**P.T.C. Harrison**, Silsoe, Bedford, UK, **Email:** paul.harrison@cranfield.ac.uk  
**R.M. Harrison**, Birmingham, UK, **Email:** r.m.harrison.ipe@bham.ac.uk  
**P. Hooda**, Kingston upon Thames, England, UK, **Email:** p.hooda@kingston.ac.uk  
**A.J. Horowitz**, Atlanta, USA, **Email:** horowitz@usgs.gov  
**H. K. Hudnell**, Chapel Hill, NC, USA, **Email:** kenhud@solarbee.com  
**D. Kolpin**, Iowa City, IA, USA, **Email:** dwkolpin@usgs.gov  
**G. Lalor**, Kingston 7, Jamaica, **Email:** glalor@cwjamaica.com  
**X. Li**, Hong Kong, China, **Email:** cexdli@polyu.edu.hk  
**L.Q. Ma**, Gainesville, FL, USA, **Email:** Lqma@ufl.edu  
**R.W. Macdonald**, Victoria, BC, Canada, **Email:** Robie.macdonald@dfo-mpo.gc.ca  
**D. Muir**, Burlington, ON, Canada, **Email:** Derek.muir@ec.gc.ca  
**M. Navarro-Alarcon**, Granada, Spain, **Email:** nalarcon@ugr.es  
**C. Neal**, Crowmarsh Gifford, Wallingford, UK, **Email:** cn@ceh.ac.uk  
**M.L. Pignata**, Cordoba, Argentina, **Email:** pignata@com.uncor.edu  
**L. Poissant**, Québec, QC, Canada, **Email:** laurier.poissant@ec.gc.ca  
**C. Poschenrieder**, Bellaterra, Spain, **Email:** charlotte.poschenrieder@uab.es  
**C. Reimann**, Trondheim, Norway, **Email:** Clemens.Reimann@ngu.no  
**E. Sabbioni**, Ispra, Italy, **Email:** enrico.sabbioni@alice.it  
**A. Smargiassi**, Montréal, Canada, **Email:** asmargia@santepub-mtl.qc.ca  
**S.H. Swan**, Columbia, MO, USA, **Email:** shswan@mac.com  
**P. Szefer**, Gdansk, Poland, **Email:** pszef@farmacja.amg.gda.pl  
**F.M. Tack**, Gent, Belgium, **Email:** filip.tack@rug.ac.be  
**J.-P. Weber**, Québec, Canada, **Email:** pweber@inspq.qc.ca

## INTRODUCTION

### ***Aims and Scope***

The journal is an international medium for publication of original research on the environment with emphasis on changes caused by human activities. It is concerned with changes in the natural levels and distribution of chemical elements and their compounds that may affect the well-being of the living world, or represent a threat to human health. Papers in applied environmental chemistry and environmental health sciences are particularly encouraged. The scope is multidisciplinary and international and the subjects covered include:

- (a) all aspects of the contamination or pollution of air, water, soil and the human food chain;
- (b) natural and human-induced environmental changes at the global, regional and local levels;
- (c) environmental risk management, remediation & treatment and environmental policy appraisal;
- (d) effects on human and ecosystem health related to abnormalities in the level and distribution of chemical elements and their compounds in the environment;
- (e) novel techniques and methods of chemistry and biochemistry applicable to environmental problems and environmental health;
- (f) gene-environment interactions.

### ***Types of paper***

*Full papers* reporting original and previously unpublished work.

*Short Communications.* A brief communication of urgent matter or the reporting of preliminary findings to be given expedited publication.

*Letters to the Editor.* A written discussion of papers published in the journal. Letters are accepted on the basis of new insights on the particular topic, relevance to the published paper and timeliness.

*Reviews.* Critical evaluation of existing data, defined topics or emerging fields of investigation, critical issues of public concern, sometimes including the historical development of topics. Those wishing to prepare a review should first consult the Editors or Associate Editors concerning acceptability of topic and length.

*Scientific Commentary.* Opinionated exposition on an important scientific issue or event designed to stimulate further discussion in a broader scientific forum. Special Issues. Proceedings of symposia, workshops and/or conferences will be considered for publication as a special issue. An Editor or Associate Editor should be contacted early in the conference planning process to get approval and for guidelines on special issues of the journal.

*Book Reviews* will be included in the Journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews are handled by the Journal Editors. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to one of the Editors.

#### **Contact details for submission**

If you are not able to submit your paper to STOTEN electronically please contact our Editorial Office at stoten@umich.edu for further instructions on how to submit by e-mail. STOTEN no longer considers hardcopy submissions.

### **BEFORE YOU BEGIN**

#### **Ethics in Publishing**

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### **Policy and ethics**

It is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects, and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

#### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Editors likewise require reviewers to disclose current or recent association with authors and any other special interest in this work.

#### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

#### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

#### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see

<http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### ***Retained author rights***

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

#### ***Role of the funding source***

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

#### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### ***Language and language services***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

#### ***Submission***

Authors may submit their articles electronically to this journal. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to a PDF file at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail, removing the need for a paper trail.

Note that contributions may be either submitted online or sent by mail. Please do NOT submit via both routes. This will cause confusion and may lead to your article being reviewed and published twice!

If you are not able to submit your paper to STOTEN electronically please contact our Editorial Office at [stoten@umich.edu](mailto:stoten@umich.edu) for further instructions on how to submit by e-mail. STOTEN no longer considers hardcopy submissions.

#### ***Referees***

All authors must suggest five potential reviewers for their paper upon submission (please include correct e-mail addresses).

The suggested referees should: (i) not be close collaborators of the author(s) (ii) not be located in the same institution as the author(s) and (iii) preferably not all be drawn from one country.

### **PREPARATION**

#### ***Use of wordprocessing software***

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible.

Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

The Abstract should be single-spaced but the rest of the manuscript should use double spacing throughout. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Underline words that should be in italics, and do not underline any other words. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

### **Article structure**

#### *Manuscript Page Limit*

There is no restriction on the number of pages but brevity of papers is greatly encouraged. The length of a paper should be commensurate with the scientific information being reported. In particular, the introductory material should be limited to a few paragraphs and results presented in figures should not be repeated in tables.

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

### **Research highlights**

Research highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Research highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/researchhighlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of

footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Number tables consecutively with Arabic numerals in accordance with their appearance in the text.

Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive title typed directly above and place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in

the article. Tables should never be included within the text, because file(s) containing tables are attached separately in the electronic submission system.

## **References**

### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated in wheat (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...."

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 1994. p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al."

For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-934) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

**Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 10 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

**Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

### ***Proofs***

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

## **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.