

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
UNIDADE ACADÊMICA DE HUMANIDADES, CIÊNCIAS E EDUCAÇÃO  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)

VICTOR HUGO SCHALY CORDOVA

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM *Mus musculus* (LINNAEUS) TRATADOS  
COM *Brassica oleracea* L. var. *itálica* (PLENCK) CULTIVADA EM ÁREA DE  
EXPLOTAÇÃO DE CARVÃO

CRICIÚMA, SC

JUNHO, 2013

VICTOR HUGO SCHALY CORDOVA

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM *Mus musculus* (LINNAEUS, 1758)  
TRATADOS COM *Brassica oleracea*. Var. itálica CULTIVADA EM ÁREA DE  
EXPLOTAÇÃO DE CARVÃO

Trabalho apresentado à banca avaliadora, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel no curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Vanessa Moraes de Andrade

CRICIÚMA, SC

JUNHO, 2013

*Dedico esse trabalho à minha família, em especial aos meus avós, Edegar e Ignês Schaly, que são os melhores avós do mundo e com sua experiência, sempre orientaram os meus passos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, pela inteligência e pela capacidade de pesquisar.

Aos meus pais, **Ana Lucia Schaly** e **Renato Córdova**, pela minha educação e por sempre me apoiarem.

Aos meus avós, **Ignês** e **Edemar Schaly**, que sempre me recebem com uma comida deliciosa e muitos doces.

À minha orientadora, **Vanessa Moraes de Andrade** que prontamente me recebeu em seu laboratório e com sua atenção, dedicação e experiência tornou possível a realização desse trabalho.

Ao pessoal do LABIM, a **Daniela**, **Adriani**, a **Francine**, a **Ana Luiza**, **Luiza**, **Gabriela**, **Maiélen**, o **Lucas** e a **Raissa**. Mas em especial a **Karina**, que compartilharam alguns fins de semana e feriados comigo, no tratamento dos animais e pelas as ajudas de última hora, que fizeram toda a diferença. A **Daniele**, pelo carinho e a companhia até tarde no LABIM e por mesmo sem saber, ter sido pra mim um exemplo de dedicação e persistência.

Aos professores que tive até hoje, com certeza todos eles contribuíram para que eu chegasse aqui, em especial o prof. **Claus Trögger Pich**, que foi quem primeiro me abriu as portas para a iniciação científica e com certeza contribuiu muito para a minha formação profissional.

Aos meus amigos, **Bock**, **Espeto**, **Jaque**, **João** e **Vanessa**, pelos momentos de lazer. E aos novos **Zeca**, **Ju**, **Aline**, **Rafael** e **Fernanda**.

Aos animais, que contribuem da forma mais nobre para a realização desse trabalho, doando a própria vida para ajudar a solucionar problemas criados por nós.

Por fim, não haveria espaço para todos os agradecimentos a todos que de uma forma e outra contribuíram para que eu estivesse onde estou.

## RESUMO

A extração de combustíveis fósseis, como o carvão, foi muito explorada na região sul de Santa Catarina, representando um grande marco na economia, principalmente na região próxima ao município de Criciúma. Porém devido à exploração do carvão ocorreram também muitos problemas ambientais. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de danos genotóxicos e mutagênicos no DNA de células do sangue periférico, fígado e córtex de camundongos expostos a Brócolis cultivados em horta experimental construída sobre depósitos controlados de rejeitos do carvão. Para isso utilizou-se a seguinte metodologia, 18 animais foram divididos em 3 grupos conforme o tipo de tratamento: Controle negativo (água destilada), suco brócolis mina, suco brócolis orgânica. Estes animais receberam uma única administração destas 3 substâncias e após 3h, 6h e 24hs da ingestão foi feita a coleta de sangue. No tempo de 24hs os animais foram mortos por deslocamento cervical e foram retirados córtex cerebral, medula e fígado para as demais análises de genotoxicidade/mutagenicidade. Após a coleta do sangue, fígado e córtex realizou-se o ensaio cometa para avaliar a genotoxicidade. Com a amostra de medula óssea realizou-se o teste de micronúcleo para avaliar o potencial mutagênico. Os animais tratados com hortaliças de área de mineração mostraram um nível de dano genético maior em relação ao grupo controle e ao grupo de hortaliças orgânicas para ambos os parâmetros. No teste de micronúcleos, os animais tratados com brócolis de área de mineração apresentaram maior incidência de células micronucleadas em relação ao controle negativo e aos animais tratados com hortaliças orgânicas e para o parâmetro de proporção (EPC/ENC) o grupo orgânico e o grupo mina diferiram do controle negativo. Podemos concluir que as hortaliças cultivadas na área estudada têm uma potencial ação genotóxica e que o brócolis (*Brassica oleracea* Var. Itálica Plenck) pode ser uma boa indicadora na detecção e bioacumulação de metais pesados no ecossistema.

**Palavras-chave:** Rejeito de carvão mineral, *Brassica oleracea* L., ensaio cometa, teste de micronúcleo, genotoxicidade

*“Aliada minha a Força é e poderosa aliada ela é. Ela cria a vida, faz crescer. Sua energia nos envolve, nos une. Luminosos seres somos nós, não essa rude matéria. Precisa a força sentir à sua volta. Aqui, entre você... eu... A árvore... A rocha... Em todo lugar!”*

*Mestre Yoda(LUCAS, G, 1990)*

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1:** Carvão

**Figura 2:** Estágios de formação do carvão

**Figura 3:** Localização dos municípios na bacia carbonífera catarinense

**Figura 4:** Animal utilizado em experimento

**Figura 5:** Localização da Unidade Minerária II da Carbonífera Criciúma S.A., A: localização da horta experimental.

**Figura 6:** Localização da Unidade Minerária II da Carbonífera Criciúma S.A., A: localização da horta experimental.

**Figura 7:** Administração do suco por gavagem.

**Figura 8:** Classes de Dano obtidas pelo Teste Cometa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
1.2 POLUIÇÃO .....	7
1.3 CARVÃO .....	8
<b>1.3.1 Rejeitos poluentes.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2 Metais pesados.....</b>	<b>12</b>
1.4 BIOINDICADORES E BIOMARCADORES .....	13
<b>1.4.1 Brassica oleracea L.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.2 Mus musculus L. ....</b>	<b>15</b>
1.5 GENOTOXICIDADE .....	16
<b>1.5.1 Mecanismos de genotoxicidade .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5.2 Testes genotóxicos .....</b>	<b>17</b>
1.6 OBJETIVOS .....	20
<b>1.6.1 Objetivos Gerais.....</b>	<b>20</b>
<b>1.6.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>2 METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
2.1 ANIMAIS E COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA.....	21
2.2 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	21
2.3 HORTALIÇAS E PREPARO DA AMOSTRA .....	22
2.4 DESENHO EXPERIMENTAL .....	22
2.5 ENSAIO COMETA .....	23
2.6 TESTE DO MICRONÚCLEO (MN) EM MEDULA ÓSSEA .....	24
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.2 POLUIÇÃO

A poluição do ambiente é algo que preocupa cada vez mais a sociedade. Percebem-se cada vez mais campanhas em prol de causas ambientais e altos investimentos públicos nesse setor. Pode-se observar no Brasil recentemente eventos como o RIO+20, que reuniram lideranças do mundo inteiro para discutir questões ambientais.

Contudo, é preciso levar em consideração o acelerado crescimento da população, o conseqüente aumento das cidades, atividades agrícolas, pecuária e, sobretudo a necessidade de combustíveis para suprir a demanda energética. Pois apesar do crescimento das tecnologias que dizem respeito a fontes renováveis, os combustíveis fósseis como petróleo e carvão ainda se apresentam como os mais utilizados, de acordo com o International Energy Agency, (2008).

As reservas brasileiras de carvão mineral conhecida totalizam 32 bilhões de toneladas "*in situ*" ocorrendo predominantemente na região sul do país, nos domínios geológicos da Bacia do Paraná, podendo, contudo, ocorrer pequenas quantidades na região sudeste no estado de São Paulo. Deste total, o estado do Rio Grande do Sul detém 89,25%, Santa Catarina 10,41%, Paraná 0,32% e São Paulo 0,02% (HORBACH et al., 1986; CRPM-BRASIL).

Em Criciúma a descoberta do carvão se deu em 1913. Os trabalhadores de minas eram constituídos por descendentes de portugueses, italianos, africanos, alemães e poloneses. Primeiramente concentrou-se a mineração ao entorno do morro Cechinel, depois nas proximidades do centro e outras localidades (CAROLA, 2004; GOULARTI FILHO; LIVRAMENTO, 2004; NASCIMENTO, 2004 apud DE SILVEIRA, 2009).

A extração de combustíveis fósseis, como o carvão, foi muito explorada na região sul de Santa Catarina, representando um grande marco na economia, principalmente na região próxima ao município de Criciúma (NASCIMENTO, 2002).

Porém devido à exploração do carvão ocorreram também muitos problemas ambientais, devido a rejeitos originários da atividade carbonífera como os minerais piríticos (SILVEIRA, 2009). O carvão se apresenta como um potencial poluidor, devido às consideráveis concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tanto na denominada "fly ash" (cinza leve) (SUCRE et al., 1978 apud. PERALBA, 1990), quanto

nos produtos de combustão e liquefação. (LAUER, 1988; ROMANOWSKY, 1988 et al. apud PERALBA, 1990).

Vários desses hidrocarbonetos têm apresentado atividade carcinogênica e/ou mutagênica, o que motivou organismos internacionais sugerirem o controle de sua presença no ambiente. (GARG et al. 1987; WHITE et al., 1979 apud. PERALBA, 1990).

### 1.3 CARVÃO

O carvão mineral (Fig.1) é um combustível fóssil, composto por uma estrutura química heterogênea altamente complexa de componentes orgânicos, constituídos por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, componentes inorgânicos e partículas discretas de matéria mineral, que formam as cinzas (LEÓN et al., 2007). O léxico internacional o define como sendo uma rocha sedimentar combustível, formada a partir de detritos vegetais, encontrando-se em diferentes estados de conservação e tendo sofrido soterramentos e compactações em bacias originalmente pouco profundas (STACH, 1975 apud. PERALBA, 1990) (Fig.2).



Figura 1- Carvão mineral  
Fonte: Click escolar

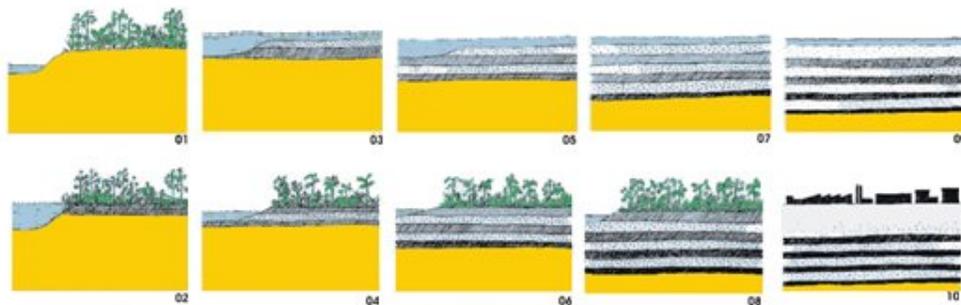


Figura 2- Estágios de formação do carvão  
Fonte: <http://www.minerals.co.nz>

1. Bacia sedimentar com vegetação (matéria orgânica) em suas bordas.
2. Situação após afundamento (subsidência) da bacia, soterramento da floresta anterior e criação de nova floresta.
3. Novo afundamento da bacia, com avanço de água sobre a área anteriormente ocupada pela floresta e soterramento da mesma por sedimento (areia e/ou argila).
4. Recuo da água com conseqüente exposição da bacia e formação de vegetação (matéria orgânica) sobre os sedimentos depositados no estágio anterior.
5. Afundamento da bacia e recobrimento da matéria orgânica (vegetação soterrada) por sedimento.
6. Recuo da água e/ou soerguimento da bacia com formação de vegetação sobre os sedimentos depositados no estágio anterior.
7. Novo afundamento da bacia e recobrimento da matéria orgânica (vegetação soterrada) por sedimento.
8. Novo recuo da água e/ou soerguimento da bacia com formação de vegetação sobre os sedimentos depositados no estágio anterior.
9. Afundamento da bacia e recobrimento da matéria orgânica (vegetação soterrada) por sedimento.
10. Situação atual. A bacia foi completamente soterrada por sedimentos de diferentes origens e a água desaparece do sistema. As sucessivas camadas de matéria orgânica soterradas passam por processos geológicos que buscam seu equilíbrio físico-químico às condições específicas do soterramento, que resulta na geração de carvão. (MINISTÉRIO PÚBLICO FEDERAL, 2006).

As rochas sedimentares são geralmente formadas por restos de animais silicosos ou carbonatados e de algas. Só o carvão é formado de plantas superiores, deferindo assim das demais rochas sedimentares (PERALBA, 1990).

O carvão é produto de um gigantesco processo químico natural, o CO<sub>2</sub> é absorvido pelas plantas, sob a influencia da luz solar, da umidade e de outros fatores, convertem-se em compostos contendo carbono, hidrogênio e oxigênio, tais como açúcares, celulose e lignina e outras substâncias complexas que são utilizadas na formação da estrutura da planta. Sob condições favoráveis esta vegetação pode se converter em uma das diferentes formas de carvão conhecidas. Sua composição possui diversos hidrocarbonetos, tais como alifáticos de cadeia normal, isopenóides acíclicos e outros, sendo que dentro deles, os hidrocarbonetos poliaromáticos constituem a maior classe de carcinogênicos químicos da atualidade e vários heterocíclicos sulfurados são também carcinógenos bem conhecidos (PERALBA, 1990).

É o combustível natural mais abundante na natureza e o mais utilizado como fonte de energia elétrica no mundo (ANEEL, 2007), constituindo dois terços dos recursos energéticos não-renováveis nacionais, sendo suas reservas vinte vezes maiores do que as do petróleo e setenta e cinco vezes superiores às do gás natural (SANCHES; FORMOSO, 1990 apud. CAMPOS; ALMEIDA; SOUZA, 2003).

Uma das maiores reservas de carvão da América Latina está localizada no Brasil, e os depósitos de maior importância econômica são encontrados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (SOARES et al., 2006), distribuindo-se em oito grandes jazidas, sete das quais no Rio Grande do Sul, e uma em Santa Catarina (GOMES et al, 1998 apud. GONÇALVES, 2012), os dois estados detêm conjuntamente 99,8% das reservas carboníferas do país (DNPM, 2004).

A Bacia Carbonífera de Santa Catarina, também conhecida com jazida *Sul - Catarinense*, está localizada ao sudeste do estado, possui um comprimento conhecido de 95 km e uma largura média de 20 km, compreendida na área delimitada pelas coordenadas 28011' a 29003' de latitude sul e 49010' a 49037' de longitude oeste (GOMES et al, 1998; BARBOSA, 2001), (Fig.3).

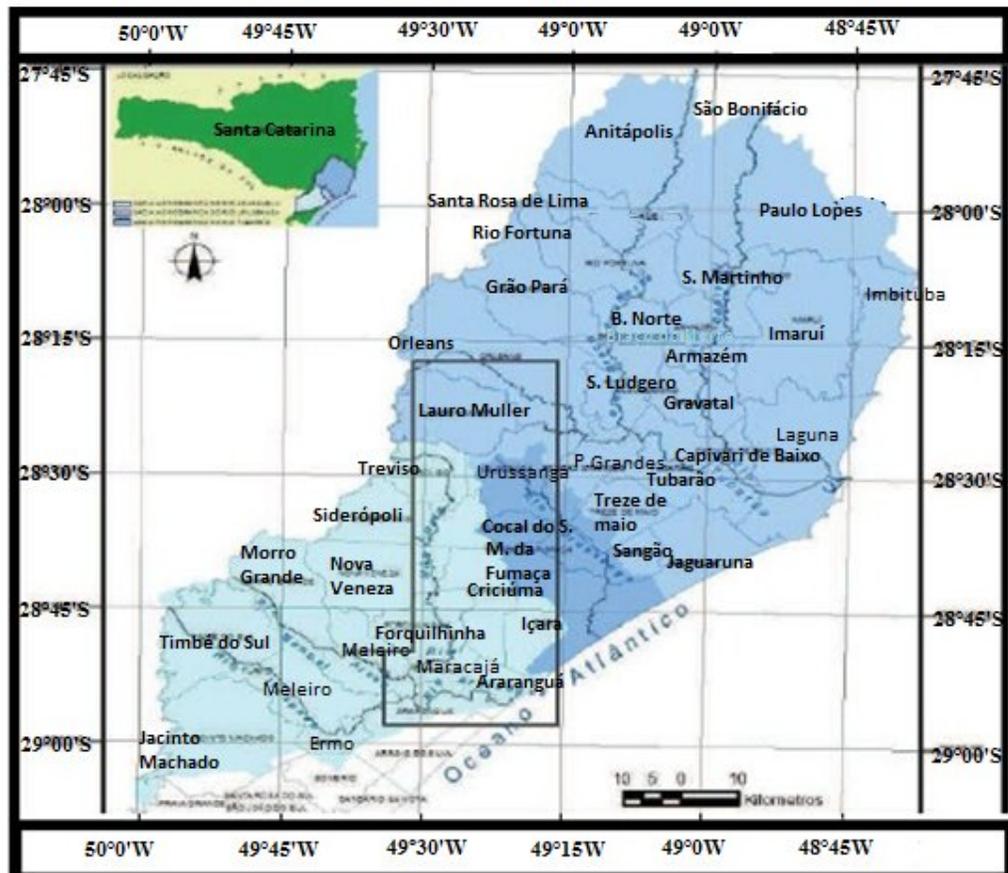


Figura3- Localização dos municípios na bacia carbonífera catarinense  
Fonte: CETEM, 2001.

Os municípios inseridos na bacia carbonífera catarinense são: Orleans, Lauro Muller, Urussanga, Siderópolis, Criciúma, Içara, Nova Veneza, Maracajá, Araranguá, Arroio do Silva, Forquilha e Treviso (MILIOLLI, 2009 apud GONÇALVES, 2012).

A exploração de carvão nessas áreas é realizada em minas subterrâneas e a céu aberto, sendo a profundidade da camada carbonífera um dos critérios para seleção entre os métodos de lavra, ou seja, a lavra subterrânea é utilizada quando a jazida de carvão se encontra em camadas mais profundas (cerca de 30m até aproximadamente 120m) e a lavra a céu aberto é utilizada, quando a jazida de carvão se encontra próxima à superfície do solo até, aproximadamente, 30m de profundidade (KLEIN, 2006 apud. LEFFA, 2008).

No processo de mineração a céu aberto, a remoção das camadas é feita de forma desordenada, provocando a sua inversão e gerando pilhas de materiais geológicos na forma de corpos cônicos, que têm na sua base a camada fértil do solo e na camada superior, os estéreis e rejeitos da mineração, causando, portanto, perda de solo fértil e sua degradação (CAMPOS; SOUZA, 2003 apud GONÇALVES, 2012).

A maioria dos campos de mineração e áreas de depósitos sem critérios técnicos não se encontra mais ativa. Porém esse fato não significa o fim da fonte poluidora.

### **1.3.1 Rejeitos poluentes**

Os rejeitos caracterizados como minerais piríticos são a principal fonte de poluição da atividade carbonífera, pois contém grande quantidade de metais pesados, principalmente ferro, manganês, zinco, cobre além de sulfatos entre outros (ZANARDI JUNIOR; ZOCHE, 2002; ZOCHE, 2004). Devido a sua oxidação estes rejeitos permanecem ativos por muito tempo, mesmo após o encerramento das atividades mineradoras, liberando grandes quantidades de drenagem ácida de minas (DAM). A DAM é uma água contaminada por possuir altos teores de ferro, alumínio e ácido sulfúrico, motivo pelo qual pode apresentar coloração esverdeada ou laranja- amarelado a avermelhada dependendo do estado predominante de ferro ( $Fe^{+2}$  ou  $Fe^{+3}$ , respectivamente) (SKOUSEN, 1998 apud. DA SILVEIRA, 2009)

Na Bacia Carbonífera Catarinense, de meados da década de 40 até o final dos anos 80 do século passado, o descarte dos rejeitos da mineração e do beneficiamento do carvão foi executado sem cuidados ambientais (COSTA; ZOCHE, 2009; ZOCHE et al., 2010). Os rejeitos eram depositados ao redor das minas, sem nenhum cuidado. Com o

aumento da demanda, seguido pelo conseqüente aumento da extração, os rejeitos passaram a serem depositados em qualquer local, sem a menor preocupação ambiental. Por ser um material a ser descartado, era oferecido à população como material de aterro, levando a um grande depósito, inclusive em regiões baixas e alagáveis. Com o processo de urbanização, os loteamentos avançaram em direção a essas áreas, destinadas à população de baixa renda. Para a construção de moradias sobre os depósitos de rejeitos era depositada uma camada tênue de argila, de 0,20 a 0,30m, a qual foi sendo paulatinamente desgastada pela erosão hídrica.

Juntamente às moradias, começou as atividades, como o cultivo de hortaliças destinadas à alimentação. O consumo de tais hortaliças pode oferecer um potencial risco genotóxico, por estarem em contato direto, através das raízes, com os metais tóxicos e mutagênicos; como os metais pesados, provenientes dos rejeitos de mina. Um fato agravante nesta situação é que a maioria das espécies vegetais que crescem nesses solos não consegue evitar a absorção dos metais pesados, mas somente limitar a sua translocação (BROOKS, 1983; ZOCHE; PORTO, 1993; SOARES et al., 2001; ZOCHE, 2002; ZOCHE; PORTO, 2008).

### **1.3.2 Metais pesados**

A expressão "metais pesados", mesmo sendo comumente usada, não é muito bem definida, podendo-se utilizar como sinônimos: "metais-traço", "elementos-traço", "micronutrientes" e "microelementos" entre outros, quando presentes em concentrações diminutas no meio ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). Designa-se metal pesado o grupo de elementos que ocorrem em sistemas naturais em pequenas concentrações e apresentam densidade igual ou acima de  $5 \text{ g/cm}^3$ , ou elementos que se encontram em concentrações inferiores a  $100 \mu\text{g.g}^{-1}$  na crosta terrestre, e também elementos que possuem número atômico maior do que 23 (COSTA, 2005; DUARTE & PASQUAL, 2000, Apud, LEFFA, 2010).

Entretanto, esses elementos-traço em altas concentrações no meio ambiente constituem um grave problema ambiental devido aos seus efeitos nocivos nos organismos, como alta toxicidade, capacidade de bioacumulação e potencialidade de induzir danos ao material genético, genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, que têm sido atribuídos aos metais pesados em humanos e/ou animais de laboratório (AGOSTINI &

WAJNTAL, 1993; PARAÍBA, 2006; PRÁ et al., 2006; SÁNCHEZ-CHARDI et al., 2008, apud. LEFFA, 2010).

De uma forma geral os metais são classificados como essenciais e não essenciais, os essenciais denominados oligoelementos como o manganês, ferro, zinco, cobre e selênio, encontram-se fisiologicamente presentes nos organismos vivos, e com elevada incidência, são encontrados naturalmente em alimentos, frutas e multivitamínicos.

Enquanto alguns são essenciais, outros são classificados como não essenciais, como o chumbo e o cádmio, e são potencialmente tóxicos e indutores de efeitos biológicos adversos mesmo em concentrações reduzidas (LOPES, 2009 apud GONÇALVES, 2012).

#### 1.4 BIOINDICADORES E BIOMARCADORES

A utilização de biomarcadores é um meio de identificar efeitos tóxicos e genotóxicos induzidos por xenobióticos.

Os biomarcadores podem ser utilizados para avaliar efeitos fisiológicos, bioquímicos, letalidade e outros, incluindo potencial mutagênico e carcinogênico. Posteriormente esses danos podem ser observados através de técnicas citogenética ou moleculares (MEJÍA, 2011).

Biomarcadores são definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental em nível individual, medido no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do status normal que não pode ser detectado no organismo intacto. Ou seja, são medidas de fluídos corporais, células, tecidos ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam, em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, compartimentais ou energéticos, a presença de substâncias contaminantes ou a magnitude da resposta do organismo alvo (ARIAS et al., 2007).

O teste de aberrações cromossômicas, quantificação de adutos de DNA, troca de cromátides e o teste de micronúcleos são alguns exemplos de testes utilizados na detecção de mutações gênicas. O teste de micronúcleos se apresenta como uma técnica rápida e simples, sendo utilizado amplamente, enquanto que o estudo de aberrações cromossômicas é apenas utilizado em situações recomendadas, como dirimir dúvidas, definir os tipos de mutação, validar outras metodologias e etc. Estes testes têm um sistema de validação internacional, e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ANDRADE, 2004).

Resultados significativos para essas técnicas prenunciam instabilidade genética, que pode representar os passos iniciais para o processo carcinogênico (SOUZA, 2005 apud. GONÇALVES, 2012).

Já os Biomonitorios, também conhecidos por organismos sentinela, vêm sendo utilizados há muito tempo para alertar as pessoas sobre ambientes perigosos. Na seleção de um biomonitor os principais aspectos a serem observados são: (a) os animais devem dividir o mesmo ambiente com o homem; (b) responder de forma semelhante a químicos tóxicos; e (c) desenvolver patologias similares como resposta a estes efeitos (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003 apud. GONÇALVES, 2012).

Em muitos trabalhos é observada a utilização de biomonitorios (LEFFA, 2008; GONÇALVES, 2012; DUARTE, 2000; RUSH, 2009; KHAMISY, 2006; MONTALVO, 2011) confrontando o uso clássico de análises físico-químicas, pois é possível levar em consideração a acumulação no organismo e estimar parâmetros letalidade e sub letalidade. (BROMENSHENK; SMITH; WATSON, 1995).

Existem diversos organismos que podem ser utilizados como biomonitorios e/ou bioindicadores, ou as duas coisas simultaneamente, dentre os quais se destacam as bactérias *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, anelídeos, artrópodes (KOVALCHUK; KOVALCHUK, 2008), microcrustáceos como *Daphnia magna* (ALVES; SILVANO, 2006) animais vertebrados aquáticos como peixes (ANDRADE, et al., 2004), vegetais como as plantas *Allium cepa*, *Tradescantia*, *Vicia faba* (KOVALCHUK; KOVALCHUK, 2007), *Baccharis trimera* (SOUZA; COSTA; ZOCHE, 2007), moluscos (SILVA et al. 2007), anfíbios e répteis (BRANDÃO, 2002), aves como os pombos (SCHILDERMAN et al., 1997), e mamíferos como *Ctenomys torquatus* (SILVA, 2000), *Rattus rattus* e *Mus musculus* (LÉON, 2007).

#### **1.4.1 Brassica oleracea L.**

*Brassica oleracea* é uma planta da família das Brassicaceae, que abrange diversas espécies de importância econômica, social e nutricional, como repolho (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.), couve-manteiga (*B. oleracea* L. var. acephala DC.) e couve chinesa (*B. oleracea* L. var. botrytis L.) (FILGUEIRA, 2005 apud. DOS SANTOS, 2011).

Originário do Mediterrâneo (SOUZA, 1983 apud. DOS SANTOS, 2011), brócolis é uma planta herbácea, folhosa (Figura 1), com grande aplicabilidade,

apresentando alta concentração de cálcio, proteínas e ácido ascórbico (FILGUEIRA, 2000).

Segundo Filgueira (2005) apud. DOS SANTOS, 2011 existem dois tipos de brócolis, tipo “Ramoso”, com cultivares de outono-inverno, como Ramoso Santana, e cultivares de primavera-verão, como Ramoso Piracicaba, além do híbrido Flórida de ampla adaptabilidade termoclimática. Outro tipo é o “Cabeça” que produz uma inflorescência central, compacta, destacando-se os híbridos Karatê e Legacy.

As plantas podem absorver metais e poluentes industriais, por isso, a presença de hortaliças em solo degradado pela mineração pode colocar em risco as populações localizadas nas proximidades que muitas vezes exploram a vegetação que se desenvolve espontaneamente sobre áreas de rejeitos de mineração ou mesmo que cultivam frutas e vegetais neste solo (COSTA; ZOCICHE, 2009).

#### 1.4.2 *Mus musculus* L.

O *Mus musculus* é um pequeno roedor da família dos murídeos, encontrado originalmente na Europa e na Ásia, atualmente é encontrado no mundo todo e geralmente associado a ocupações urbanas. Tem cerca de 8 cm de comprimento, pelagem macia, branca ou cinza-acastanhada, mais clara nas partes inferiores, orelhas grandes e arredondadas e cauda nua e longa. (UNIFENAS).



Figura 4-animal utilizado em experimento  
Fonte: Autor

## 1.5 GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade está relacionada ao potencial que agentes físicos ou químicos possuem de induzir mutações em células somáticas, ou naquelas que podem ser transmitidas a gerações futuras (SILVA et al., 2000. Apud LEFFA). Devido aos componentes do carvão e de seus subprodutos, o carvão passa a ser alvo crescente de pesquisas relacionadas à mutagênese. (LEFFA, 2008).

Diversos estudos têm mostrado os efeitos genotóxicos associados ao carvão, como aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico (SRÁM et al.,1985; AGOSTINI; OTTO; WANTAL, 1996). Também foram observados efeitos genotóxicos em roedores (*Mus musculus*) e répteis (*Iguana iguana*) próximos a áreas de mineração (MONTALVO, 2012). Em outros estudos, ainda, o carvão se apresenta como potencialmente genotóxico em roedores como *Ctenomys torquatus*, *Rattus rattus* (SILVA et al., 2000; LÉON, et al.,2007.)e moluscos(*Helix aspersa*), expostos à resíduos de carvão através da via dérmica e da ingestão de *Lactuca sativa* L. cultivada em área minerada (LEFFA, 2008).

### 1.5.1 Mecanismos de genotoxicidade

A toxicidade de metais e de seus compostos depende largamente da sua biodisponibilidade, ou seja, dos mecanismos de captação através de membranas celulares, distribuição intracelular e ligações a macromoléculas celulares. (LEFFA, 2010).

Os metais podem ainda sofrer transformações no organismo, como reações de oxi-redução e alquilação. Estudos mostram efeitos de alquilação em cultura de células de córtex por metais como mercúrio, ferro e chumbo (RUSH, 2008).

Existem basicamente três mecanismos predominantes de toxicidade dos metais: (1) interferência com regulação celular redox e indução de estresse oxidativo, o qual pode causar dano oxidativo no DNA ou desencadear cascatas sinalizadoras que levam a estimulação do crescimento celular; (2) a inibição do principal sistema de reparo do DNA, resultando em instabilidade genômica e acúmulo de mutações críticas; (3) desregulação da proliferação celular pela indução de vias sinalizadoras ou inativação de controles de crescimento, tais como os genes supressores de tumor (BEYERSMANN & HARTWIG, 2008, Apud. LEFFA, 2008).

Entretanto a indução de dano no DNA melhor descrita na literatura é através do estresse oxidativo, que ocorre quando há um desequilíbrio, criado pela excessiva geração de oxidantes e/ou uma diminuição da capacidade antioxidante de enzimas específicas, sendo que as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas *in vivo* podem causar danos às biomoléculas (GUO; YANG; WU, 2008, apud. LEFFA, 2008). Os metais pesados tem se mostrado capazes de induzir estresse oxidativo em organismos vivos através da produção de EROs, que reprimem a capacidade celular de manter uma estado reduzido. EROs induzidas por metais causam danos à proteínas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e muitas outras disfunções, incluindo a morte celular. Um estudo aponta a indução de estresse oxidativo por metais em culturas de células humanas (SIMMONS, 2011).

### **1.5.2 Testes genotóxicos**

Os testes genotóxicos representam uma grande importância no estudo de impactos ambientais, pois demonstram danos que possam não se manifestar no indivíduo, podendo, porém causar danos em gerações futuras.

Em função da ampla implicação ecológica associada à genotoxicidade, a detecção e quantificação de danos genéticos são de grande interesse em estudos ambientais. O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um sensível indicador de genotoxicidade e um efetivo biomarcador para o monitoramento ambiental (SHUGART, 1990), gerando informações essenciais para agências regulatórias (RIBEIRO et al., 2003).

#### **1.5.2.1 Ensaio cometa**

Dentre as técnicas para determinação genotóxica aplicada, o ensaio cometa apresenta grande versatilidade, sensibilidade, economia e simplicidade em sua execução, e vem sendo amplamente utilizado como uma ferramenta de avaliação de dano e reparo no DNA, tanto quantitativamente, quanto qualitativamente em populações de células individualizadas (OLIVE; BANATH, 2006). O teste tem sido proposto como uma ferramenta para a detecção de agentes genotóxicos, sendo aplicado sob condições laboratoriais e em biomonitoramento de diversas regiões fortemente impactadas

(MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; WINTER et al., 2004; FRENZILLI et al., 2009; BARBOSA et al., 2010).

#### 1.5.2.2 Teste do micronúcleo

Outro teste utilizado para determinação de mutagenicidade é o teste do micronúcleo desenvolvido inicialmente por Boller e Schmid (1970) em eritrócitos de medula óssea e sangue de camundongos, a fig. 5 mostra as células que são avaliadas e a presença do micronúcleo. Atualmente é um ensaio *in vivo* amplamente utilizado em diversos organismos para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (HAYASHI et al., 1994), sendo a aplicação do teste em medula óssea e sangue periférico um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica (FENECH, 2000).

Hooftman e Raat (1982) sugerem o uso do teste como uma alternativa à análise de aberrações cromossômicas, ressaltando que a uniformidade das células do sangue periférico torna a contagem de alterações morfológicas nucleares (AMN) viável.

A técnica permite também, a distinção entre eritrócitos policromáticos (EPC) ou eritrócitos jovens, que durante o período de 10 a 24 horas são RNA positivos e coram-se em roxo e eritrócitos normocromáticos (ENC) ou eritrócitos maduros, que se coram em tons de laranja (corante de Giemsa) (Fig. 5). As frequências de micronúcleos são determinadas em eritrócitos policromáticos (EPC). Além da avaliação da frequência de EPC micronucleados, a percentagem de EPC no total de eritrócitos (ou a taxa de EPC/ENC) é determinada com o objetivo de avaliar a toxicidade (RIBEIRO, 2003 apud ANGELONI, 2010).

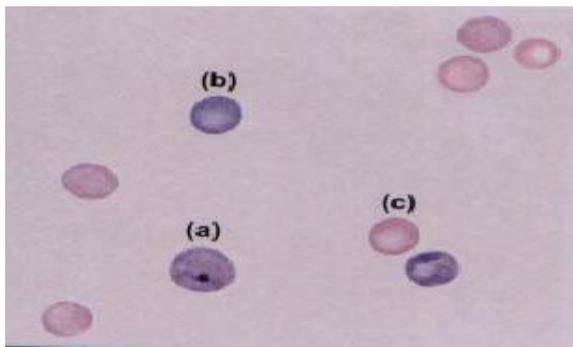


Figura 5: Eritrócitos normocromáticos (ENC) com micronúcleo (a) e sem micronúcleo (b), Eritrócito policromáticos (EPC) (c).  
Fonte: RIBEIRO, SALVADORI 2003

Assim sendo, o presente trabalho levanta a hipótese de que danos genéticos sejam causados pela ingestão de *Brassica oleracea* var, Itálica cultivadas em área de mineração.

## 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 Objetivos Gerais

Avaliar o potencial genotóxico de folhas de brócolis cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos da exploração do carvão em células sanguíneas, hepáticas, córtex e medula óssea de camundongos.

### 1.6.2 Objetivos Específicos

- Verificar a Frequência de Dano (FD) e o Índice de Dano (ID) presentes no DNA de células sanguíneas, hepáticas e córtex de camundongos expostos e não expostos à alimentação com suco de *Brassica oleracea* var. itálica (brócolis) cultivadas sobre depósitos de rejeitos da exploração do carvão;
- Avaliar a mutagenicidade do suco de *Brassica oleracea* var. itálica (brócolis) cultivadas sobre depósitos de rejeitos da exploração do carvão em células de medula óssea de camundongos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 ANIMAIS E COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

Foram utilizados 36 camundongos Swiss, machos, adultos, provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), mantidos num ciclo claro-escuro de 12 horas, água e comida oferecidas *ad libitum*. Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, segundo o n° de protocolo 110/2011.

### 2.2 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O local de coleta das amostras foi na Unidade Mineraria II da Carbonífera Criciúma S.A, coordenadas 28°47'19''S e 49°26'32''O, Município de Forquilha, Santa Catarina, Brasil (Fig. 6). A horta foi construída sobre um antigo depósito de rejeito da exploração do carvão. Segundo informação pessoal do Engenheiro responsável, neste depósito, a última camada de rejeitos depositados foi recoberta por uma camada de aproximadamente 0,50 m de argila de alta densidade. Sobre esta camada de argila, foi espalhada uma camada de solo vegetal de aproximadamente 0,30 m, material obtido da zona superficial (0 a 0,30 m) do perfil natural do solo de uma área de empréstimo, e sobre esta camada de solo vegetal foram construídos os canteiros da horta.



Figura 6 - Localização da Unidade Minerária II da Carbonífera Criciúma S.A., A: localização da horta experimental.

Fonte: Google Maps

Os canteiros foram construídos a partir de uma mistura de solo vegetal, cama de aviário e cinza de casca de arroz queimada. Recebe ainda, além de tais materiais, adubação química com adubo NPK. A horta é cultivada o ano inteiro, sendo as hortaliças destinadas a alimentação dos funcionários.

### 2.3 HORTALIÇAS E PREPARO DA AMOSTRA

A hortaliça *Brassica oleracea* (brócolis) foi fornecida de uma horta construída sobre depósitos controlados de exploração do carvão (grupo teste). O grupo controle foi composto de hortaliças tipo brócolis, fornecidas pelo senhor Pedro Alcino Budny, um produtor orgânico certificado do município de Içara, SC. O modelo animal de exposição às hortaliças foi feito por meio de gavagem do suco da hortaliça obtido através do uso de um processador de alimentos, em uma dose de 0,1 mL/10 g de peso corporal. A fig. 7 mostra a administração do suco por gavagem.



Figura 7- Administração do suco por gavagem  
Fonte: Autor

### 2.4 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado através da administração de água destilada e suco (extrato) da planta, seguindo o desenho experimental abaixo:

Os animais foram divididos em 3 grupos, constituindo 6 animais por grupo e tratados com uma única administração dos sucos ou controles por gavagem. As coletas de sangue foram feitas em 3h, 6h e 24h após a administração aguda por incisão na veia caudal.

Grupo 1 – controle negativo – administração de água destilada;

Grupo 2 – suco de folha de brócolis cultivada de modo orgânico;

Grupo 3– suco de folha de brócolis cultivada sobre depósito controlado de rejeito da exploração do carvão;

Após 24 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e foi coletado fígado e córtex para o ensaio cometa e medula óssea para o teste de micronúcleo.

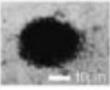
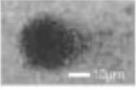
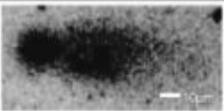
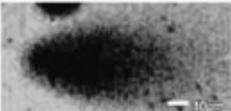
## 2.5 ENSAIO COMETA

O emprego do Ensaio Cometa foi realizado seguindo os protocolos internacionais já estabelecidos para a sua realização (TICE et al., 2000). O preparo das lâminas foi realizado a partir da mistura de 5  $\mu$ L de sangue com 95  $\mu$ L de agarose Low Melting Point (0,75%). Colocou-se então, tal mistura em lâminas de microscópio pré-revestida com agarose normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5 NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% DMSO) a 4° C por um período mínimo de 1 hora e máximo de duas semanas. Após este período as lâminas forão incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para que ocorra o desenovelamento do DNA. Realizou-se então a corrida eletroforética a 25V e 300mA por 15 minutos. Todas as etapas ocorreram sob luz indireta. Logo após, as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado para análise em microscópio óptico (COLLINS, et al., 1999).

Foi realizada a avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes de acordo com o tamanho da cauda, sendo 0 a classificação para ausência de cauda, ou seja DNA sem dano, até quatro para o comprimento máximo de cauda. Tendo assim um Índice de Danos (ID) para cada grupo variando de 0 ( $100 \times 0 = 0$ ; 100 células observadas

sem dano) a 400 (100 x 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo). Calculou-se a Frequência de Dano (FD em %) em cada amostra com base no número de células com caudas vs. número de células sem cauda (COLLINS, et al., 1999). A fig. 8 mostra os núcleos e seus respectivos danos no DNA.

Tabela 1: Classes de Dano obtidas pelo Teste Cometa

<b>Dano observado no DNA</b>	<b>Cabeça/Cauda</b>	<b>Classe de dano</b>
	<b>Sem cauda</b>	0
	≤1	1
	1 – 2	2
	≥2	3
	<b>Sem cabeça</b>	4

Fonte: VILLELA et al., 2006

## 2.6 TESTE DO MICRONÚCLEO (MN) EM MEDULA ÓSSEA

O teste do micronúcleo foi realizado segundo os protocolos padrões internacionais (MAVOURNIN et al., 1990). Após a eutanásia, retirou-se a medula óssea do fêmur dos camundongos com o auxílio de uma agulha histológica. Com este material foram feitas duas lâminas por animal, macerando a medula com soro bovino fetal sobre uma lâmina de microscopia, fazendo-se um esfregaço direto. Após a secagem das lâminas, estas foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato pH 5,8, por 5 minutos, sendo logo após analisadas por um observador cego. Foram analisados 2000 Eritrócitos policromáticos (EPCs) por animal, sendo a detecção dos efeitos de citotoxicidade realizada

através da contagem de EPCs em relação aos Eritrócitos normocromático (ENCs) em 100 células (EPC/ENC).

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram apresentadas em média  $\pm$  D.P. de 6 animais para cada tempo em cada grupo. Diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey e quando necessário foi usado o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mineração de carvão tem uma potencial capacidade poluidora, contém uma mistura heterogênea de mais de 50 elementos, incluindo os óxidos e outros elementos como sílica, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), metais pesados e cinzas (LÉON et al., 2007).

Uma das formas principais de contaminação pelo carvão é a poluição hídrica, que é observada nas áreas de mineração e é decorrente da geração de efluentes ácidos provenientes das minas e principalmente dos rejeitos de carvão. Esta característica ácida dos efluentes da mineração ocorre principalmente pela presença da pirita ( $\text{FeS}_2$ ), um mineral sulfetado muito comum nos carvões brasileiros, principalmente em Santa Catarina, onde cerca de 8% do carvão bruto é formado por enxofre piritoso (GÖTHER, 1993 apud. LEFFA).

Muitos desses elementos estão presentes nos rejeitos do carvão, enriquecidos com substâncias genotóxicas e com alto risco tóxico, podendo provocar alterações nas células, tecidos, populações e ecossistemas (AGOSTINI et al. 1996; SÁNCHEZ-CHARDI et al., 2008).

Extratos de carvão têm demonstrado citotoxicidade e mutagenicidade em organismos de mamíferos (ULKER et al., 2008 apud. MONTALVO et. al.; 2012). Shins et. al. (1995) apresenta em um estudo, um alto dano oxidativo em DNA de linfócitos retirados de mineradores de minas de carvão.

As plantas também podem ser danificadas quando expostas ao excesso de metais pesados em seu ambiente de crescimento (CARDOSO; NAVARRO; NOGUEIRA, 2003). Um estudo mostra a potencial genotoxicidade do Fe em arroz (*Oryza sativa* L.) (STEIN, 2009).

Um outro estudo mostra efeitos de fitotoxicidade, como redução no crescimento de raízes em *Allium cepa* expostas ao sedimento de banhados de biopolimento de efluentes de mineração (MANOEL, 2009).

Silva (2010) demonstrou a presença de metais como Fe, Mn, Zn, Cu, Co entre outros em sedimento de açudes afetados por rejeitos de mineração. Outro estudo ainda, encontrou tais metais em sedimentos de banhado de biopolimento de efluentes de mina (MANOEL, 2009).

Neste estudo foram empregados o ensaio cometa e o teste de micronúcleos, deve-se, porém considerar que as duas técnicas possuem natureza distinta, com vantagens e

restrições, o ensaio cometa detecta lesões reversíveis, enquanto que o teste de micronúcleo detecta lesões mais persistentes ao DNA e não passíveis de reparo (SOUZA, 2005).

No ensaio cometa, foram avaliados os parâmetros de frequência e índice nos grupos controle, hortaliças orgânicas e hortaliças de mina, em sangue em três tempos diferentes após a administração (3, 6, 24h), fígado e córtex.

Os resultados do Ensaio Cometa no sangue periférico de animais tratados com o suco de brócolis orgânico e da mina, bem como o controle negativo estão apresentados na Tabela 2.

Foram feitas 3 coletas de sangue (3h, 6h e 24h) de modo a avaliar o pico de genotoxicidade, bem como levar em consideração o reparo do material genético.

O controle se mostrou significativamente maior do que o grupo de hortaliças orgânicas em ambos os parâmetros (ID e FD). Apesar de estatisticamente significante, biologicamente, essa diferença não é válida, considerando-se que os valores são muito baixos, dentro dos limites considerados normais para esse teste. E é necessário ainda levar em consideração o adoecimento dos animais, bem como feridas pelo corpo, hematúria, levando a um estresse comportamental o que supostamente pode induzir estresse nos animais, que pode também levar a um estresse oxidativo, causando danos do DNA.

Tabela2- Detecção de danos em DNA de sangue periférico de *Mus musculus* em diferentes tempos, ao suco de *Brassica oleracea* Var. Itálica cultivada em área de exploração de carvão, usando o Ensaio Cometa.

Grupo	Análise	Sangue		
		3h	6h	24h
Controle	ID	7,50±4,60* <sup>1</sup>	10,86±8,69	8,30±5,01
	FD	4,75±3,28* <sup>2</sup>	6,88±4,21	5,50±3,44
Orgânica	ID	1,00±1,26	3,50±2,35	4,83±5,64
	FD	0,83±0,98	3,00±2,00	2,67±2,73
Mina	ID	6,57±4,47	17,13±14,11	5,56±5,20
	FD	2,88±2,53	8,50±6,65	3,56±3,28

\*Diferença significativa em relação ao grupo de hortaliças orgânicas 1- p=0,0244, 2- p=0,0052 (Kruskal-Wallis)

ID= Índice de dano FD= Frequência de dano

Leffa (2008) realizou estudos com caracóis expostos em rejeitos de mineração, utilizando a metodologia do ensaio cometa na hemolinfa dos animais, em diferentes períodos de tempo, sendo que os rejeitos se mostraram genotóxicos apenas após 24 horas de exposição, apresentando o maior índice de dano após 48 horas de exposição, o que pode

sugerir que se necessite de uma exposição por um período de tempo maior para se observar um dano significativo.

É necessário ainda levar em consideração o mecanismo de reparo, considerando que células sanguíneas se renovam com maior facilidade. Outra hipótese é tipo de dano causado.

Os micronúcleos podem ser formados por quebras na fita dupla de DNA e ficarem excluídos das células filhas durante a divisão celular (SALAMONE et. al., 1980). Esse tipo de dano pode ser detectado também pelo ensaio cometa. Porém, os micronúcleos também podem ser formados se cromossomos inteiros ficarem excluídos do núcleo (efeito aneugênico) e esse tipo de mutação dificilmente é detectado pelo ensaio cometa (FREITAS, 2007).

Os resultados do ensaio cometa para o fígado estão representados na Tabela 3.

Tabela3- Detecção de danos em DNA de células hepáticas de *Mus musculus* em diferentes tempos, ao suco de *Brassica oleracea* Var. Itálica cultivada em área de exploração de carvão, usando o Ensaio Cometa.

<b>Fígado</b>		
<b>Grupo</b>	<b>FD</b>	<b>ID</b>
Controle	50,93 ± 30,00	167,53 ± 127,73
Orgânica	76,17 ± 22,52 <sup>1</sup>	225,83 ± 131,37 <sup>2</sup>
Mina	67,78 ± 15,23	218,89 ± 58,00

ID= Índice de Dano (0 = sem danos; 400 = dano máximo), FD = Frequência de Danos (%), valores avaliados em Média ± Desvio Padrão. 1- p=0,087, 2-p=0,05688

Não houve significância de dano entre os grupos para ambos os parâmetros (ID e FD). Esses resultados se assemelham aos de Gonçalves (2012), no qual camundongos foram tratados com suco de *Lactuca sativa* L. e não apresentaram danos significativos em células hepáticas.

Os resultados do ensaio cometa para o córtex estão representados na Tabela 4. O grupo mina apresentou significância de dano em relação ao grupo orgânico e ao grupo controle, para ambos parâmetros (ID e FD), sendo ID e FD do grupo mina superiores aos grupos controle e mina.

Não houve dano significativo entre os grupos controle e orgânica.

Tabela4- Detecção de danos em DNA de células de córtex de *Mus musculus*, ao suco de *Brassica oleracea* Var. Itália cultivada em área de exploração de carvão, usando o Ensaio Cometa.

<b>Córtex</b>		
<b>Grupo</b>	<b>FD</b>	<b>ID</b>
Controle	29,92±21,93	57,67±58,21
Orgânica	39,00±21,36	58,83±32,24
Mina	93,11±4,51*	330,11±29,21*

\*Diferença significativa em relação ao grupo controle e ao grupo orgânica ( $p < 0,0001$ ) (Kruskal-Wallis)  
 ID= Índice de Dano (0 = sem danos; 400 = dano máximo), FD = Frequência de Danos (%), valores avaliados em Média ± Desvio Padrão.

O córtex apresentou elevados valores de danos nos grupos, em ambos os parâmetros (ID e FD) e mostrou o grupo mina com danos significativamente maiores do que os grupos controle e hortaliças orgânicas. Gonçalves (2012) também apresentou resultados parecidos estes, para camundongos tratados com suco de *Lactuca sativa* L., apresentando valores de danos elevados e danos significativos no grupo mina em relação aos grupos controles de hortaliças orgânicas.

Estudos atribuem ao Mn um potencial efeito tóxico ao sistema nervoso. Dos Santos (2009) apresenta um estudo do mecanismo de toxicidade do Mn no sistema nervoso central, que apresenta um potencial para causar uma síndrome que se assemelha à Doença de Parkinson, que é caracterizada por deficiência intelectual e alteração no estado de humor.

Outro metal, também citado como responsável por efeitos neurotóxicos é o Fe. Fernandez et. al. (2007) faz uma revisão acerca de efeitos neurodegenerativos do Fe. Contudo, há poucos estudos acerca de efeitos genotóxicos em córtex.

A tabela 5 ilustra os resultados do teste de micronúcleos realizado em células de medula óssea de camundongos tratados com os dois tipos de brócolis (orgânico e mina) e com água destilada (controle negativo) sob dois aspectos: relação EPC/ENC (parâmetro de toxicidade) e a frequência de micronúcleos (parâmetro de mutagenicidade).

Para a frequência de micronúcleos o grupo mina apresentou uma diferença estatística em relação ao grupo controle e ao grupo de hortaliças orgânicas, com valores de  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Dunn). E para a relação EPC/ENC o grupo de hortaliças orgânicas e mina diferiram do controle, com o  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Dunn).

Tabela 5: Avaliação da mutagenicidade em camundongos expostos e não expostos ao tratamento de forma aguda e crônica ao suco de *Brassica oleracea* cultivada em área de exploração de carvão, usando o Teste de Micronúcleos em medula óssea.

<b>Grupo</b>	<b>MNEPC</b>	<b>EPC/ENC</b>
Controle	0,13±0,35	0,65±0,10
Orgânica	0,60±0,89	1,87±0,51#
Mina	7,11±2,32*	1,55±0,51#

\*Diferença significativa em relação ao grupo controle e ao grupo orgânica  $p < 0,05$  (ANOVA, Kruskal-Wallis-Dunn)

# Diferença significativa em relação ao grupo controle  $p < 0,05$  (Tukey)

Eritrócitos Policromáticos, ENC = Eritrócitos Normocromáticos, MNEPC = Eritrócitos Policromáticos Micronucleados, MNENC = Eritrócitos Normocromáticos Micronucleados; Valores avaliados em Média ± Desvio Padrão.

O Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongo é amplamente utilizado na avaliação da ação genotóxica de substâncias químicas (PEREIRA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2007; ACEVEDO *et al.*, 2006 apud. MEIRELES, 2012). Os micronúcleos (MN) são estruturas que resultam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que se perdem na divisão celular e assim, não são incluídos nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (HEDDLE *et al.*, 1973). Na telófase essas regiões cromossômicas são incluídas nas células filhas onde podem fundir com o núcleo principal ou formar um ou mais, pequenos núcleos secundários no citoplasma, os micronúcleos (SARTO *et al.*, 1987). Desse modo o micronúcleo pode ser considerado um marcador biotecnológico eficaz na avaliação de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos de agentes potencialmente genotóxicos (MEIRELES, 2012).

O micronúcleo desenvolvido com material de medula óssea de roedores é um teste aceito pelas agências internacionais e institucionais governamentais para avaliação de genotoxicidade. É utilizado na bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001 apud. MEIRELES, 2012).

No nosso estudo, o teste de micronúcleos indicou uma maior incidência de micronúcleos encontrados no grupo tratado com *B. oleracea* da área de mineração em relação ao grupo tratado com *B. oleracea* orgânica e ao controle negativo (água destilada). Esse resultado indica ação genotóxica das hortaliças cultivadas na área de mineração estudada.

Diversos autores têm relatado a ação genotóxica dos rejeitos de carvão e dos metais presentes. Montalvo (2012) demonstrou, utilizando o teste de micronúcleos, o efeito mutagênico em *M. musculus* e *I. iguana* coletadas próximas a áreas de mineração na

Colômbia. LEFFA (2008) faz uma revisão acerca dos mecanismos de genotoxicidade de metais em áreas de mineração de carvão. Um estudo utilizando o ensaio cometa e o teste de micronúcleos foi feito na bacia hidrográfica do lago Guaíba, no Rio Grande do Sul e mostrou uma indução de dano no mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) expostos em amostras de água do rio Jacuí, na qual houve atividades de extração de carvão no passado. (VILLELA, 2006).

Como mostrado, vários estudos apresentam resultados concordantes com os nossos, indicando potencial efeito genotóxico e mutagênico causados em diferentes espécies de plantas e animais por parte de rejeitos de carvão e metais pesados encontrados nos mesmos. Embora outros testes sejam necessários para se conhecer os metais envolvidos nos processos de mutagenicidade e genotoxicidade, os nossos resultados já demonstram tais efeitos associado ao consumo da hortaliça estudada.

#### 4 CONCLUSÃO

A *Brassica oleracea* cultivadas sobre o rejeito de carvão apresentaram uma potencial capacidade genotóxica, demonstrada no teste de micronúcleos e no ensaio cometa em células de córtex. O consumo de tal hortaliça pode oferecer danos à saúde humana, tendo em vista que se mostrou mutagênico quando avaliada pelo teste de micronúcleo em medula óssea e genotóxico em células do córtex, demonstrado pelo ensaio cometa.

Mais estudos são necessários para termos uma avaliação mais precisa das ações tóxicas e genotóxicas que podem ser causada pela *B. oleracea* cultivada em área de mineração, dentre eles podemos citar a identificação de metais presentes, tanto no solo como na hortaliça e a realização de um estudo de tratamento crônico, envolvendo um maior tempo de tratamento para se avaliar efeitos genotóxicos sob uma maior exposição.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J.M.S. ; OTTO, P. L.; WAJNTAL, A. **Chromosome damage in underground coal miners: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes of unexposed individuals to plasma from at-risk groups.** Brazilian Journal of Genetics. v. 19, n. 4, p. 641-646, 1996.
- ALEXANDRE, N. Z. **Diagnóstico ambiental da região carbonífera de Santa Catarina: degradação dos recursos naturais.** Revista Tecnologia e Ambiente, Criciúma, v. 5, n. 2, p. 35-53, jul./dez. 1999.
- ANDRADE, V. M. **Avaliação dos efeitos da poluição em duas espécies de peixes dos rios Tramandaí e mampituba (RS) através do teste de micronúcleo e ensaio cometa.** Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular ) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2004.
- ANEEL, A.N.D.E.E. **Fontes não-renováveis- Carvão Mineral.** Capítulo 9: Parte III Atlas de Energia Elétrica do Brasil. Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), 2007.
- ANGELONI, M. J. **Avaliação do potencial genotóxico e antígenotóxico de *Melissa officinalis*.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)- Universidade do Extremo Sul Catarinense- UNESC, Criciúma, 2010. 72 f.
- ARIAS, A.R.L. ; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos.** Ciência & Saúde, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. **Cadmium toxicity in plants.** Brazilian Journal of Plant Physiology, Buenos Aires, v. 17, p. 21-34, 2005.
- BEYERSMAMM, D.; HARTWIG, A. **Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms.** Archives of toxicology, Bremen, v. 82, p. 193-512, maio 2008.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução CONAMA n. 001 de 23 de janeiro de 1986. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 1986. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Acesso em: 28 mar. 2012.
- BROOKS, R.R. **Biological methods of prospecting for minerals.** New York: Willey-Interscience, 322p. 1983.
- BROWN, R. E. **Significance of trace metals and nitrates in sludge soils.** Journal WPCF, v. 47, n. 12, p. 2863-2875, dez. 1975.
- CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, J.A., SOUZA, L.S. **Avaliação de três áreas de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Müller, Santa Catarina.** Revista Brasileira de Ciência e Solo, v. 27, p. 1123-1137, 2003.

CARDOSO, E.J.B.N.; NAVARRO R.B.; NOGUEIRA M.A. **Absorção e translocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob doses crescentes deste nutriente.** Revista Brasileira Ciência e Solo, v. 27, p. 415-423, 2003.

Carvão Mineral. Disponível em:

<http://www.clickescolar.com.br/wp-content/uploads/2010/11/carvao-mineral-300x210.jpg>. Acesso em: 28 jan. 2013.

CETEM – CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL. **Projeto conceitual para recuperação ambiental da Bacia Carbonífera Sul Catarinense. Relatório Técnico elaborado para o SIECESC.** v.1 e 2. 2001.

COLLINS, A.R., **Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer.** BioEssays, Scotland, v. 21, p. 238-246, mar. 1999.

CONSTANTINO, L. C. **Avaliação do dano oxidativo em tecido hepático de camundongos tratados com *Baccharistrimera* (less.) Dc. de ocorrência em solo degradado pela mineração de carvão, Treviso, SC.** 2007. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

COSTA, S.; ZOCCHÉ, J. J. **Fertilidade de solos em áreas de mineração de carvão na região sul de Santa Catarina.** Revista Árvore, v. 33, p. 665-674, 2009.

COSTA, S.; ZOCCHÉ, J. J.; ZOCCHÉ-DE-SOUZA, P. **Absorção de metais pesados (Zn e Pb) por *Axonopus obtusifolius* (Radi) em áreas degradadas pela mineração de carvão, SC, Brasil.** Revista Brasileira de Biociências, Criciúma, v.5, p. 765-767, 2007.

CPRM, Serviço Geológico do Brasil. **Roteiro geológico sobre a coluna White (Santa Catarina): carvão mineral.** Disponível em: [http://www.cprm.gov.br/geocoturismo/coluna\\_white/carvaomineral.html](http://www.cprm.gov.br/geocoturismo/coluna_white/carvaomineral.html). Acesso em: 13 mar 2013.

DA SILVEIRA, F.Z.; DEFAVERI, T.M.; RICKEN, C.; ZOCCHÉ, J.J.; PICH, C.T. **Toxicity and genotoxicity evaluation of acid mine drainage treatment using *Artemia sp.* And *Geophagusbrasiliensis* as bioindicators.** In: BARNHISEL, R.I. (Ed.). National Meeting of the American Society of Mining and Reclamation, Billings, MT Revitalizing the Environment: Proven Solutions and Innovative Approaches. Lexington: ASMR, 2009. p. 1725-1742.

DAMIANI, A. P. **Metais pesados e danos no DNA de células sanguíneas de morcegos insetívoros em áreas de mineração de carvão da Bacia Carbonífera Catarinense.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2010. 61 f..

DE FAVERI, T.M.; SILVEIRA, F.Z.; RICKEN, C.; ZOCCHÉ, J.J.; PICH, C.T. **Evaluation of acid mine drainage treatment using *Artemia sp.* and *Allium cepa* as bioindicators of toxicity and genotoxicity.** In: Barnhisel, R.I. (Ed.). National Meeting of the American Society of Mining and Reclamation, Billings, MT Revitalizing the Environment: Proven Solutions and Innovative Approaches. Lexington: ASMR. 2009. p. 283-301.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL (DNPM) - **Informativo Anual da Indústria Carbonífera**. Brasília, 2007.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL(DNPM). **Informe Mineral: Desenvolvimento & Economia mineral**. Brasília, 2008.

DOS SANTOS, D. M. **Desenvolvimento de um modelo *in vitro* para o estudo do mecanismo de toxicidade do manganês a nível do sistema nervosa central**. . 106 f. Dissertação de Mestrado ( Química Farmacêutica e Terapêutica)- Faculdade de Farmácia de Lisboa, Lisboa, 2007.

DUARTE, R. P. S.; PASQUAL, A. **Avaliação do cádmio (Cd), chumbo (Pb), níquel (Ni) e zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos**. Energia na agricultura, vol. 15 n. 1, 2000.

Estagio de sedimentação do carvão. Disponível em:

[https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/conteudo/levantamento\\_minas/mineracao\\_acp.htm](https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/conteudo/levantamento_minas/mineracao_acp.htm). Acesso em: 28 jan. 2013.

FARBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEIL, K. L. **The Comet assay: a comprehensive review**. Mutation Research, Provo, v. 339, p. 37-59, fev. 1995.

FERNANDEZ, L. L.; FORNARI, L. H. T.; BARBORA, M. V.; SCHRODER, N. **Ferro e neurodegeneração**. Scientia Medica, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 218-224, out./dez. 2007.

FERREIRA, A. S.; CAMARGO, F. A. O.; TEDESCO, M. J.; BISSANI, C. A. **Alterações de atributos químicos e biológicos de solo erendimento de milho e soja pela utilização de resíduos de curtume e carbonífero**. Revista Brasileira Ciência do Solo, Ouro Preto, v. 27, p. 755-763, maio 2003.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa-MG: UFV, 2000. 402 p.

FREITAS, M.; ZOCHE, J. J.; ESSEMAM DE QUADROS, K. **Metais pesados (Mn e Zn) em *Typhadomingsis* Pers. em áreas de mineração de carvão**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5. p. 789-791, jul. 2007.

FREITAS, P. S. **Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* (Mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos swiss *in vivo***. Dissertação de Mestrado (Genética)- Universidade José do Rosário Vellano. Alfenas, MG. 92 f. 2007.

GOMES, A.M.; FERREIRA, L.F. ALBUQUERQUE. **Carvão fóssil**. Estudos avançados, v. 12, n. 33, p. 89-106, Porto Alegre, 1998.

GONÇALVES, C. D. **Avaliação dos danos genotóxicos ao DNA de camundongos expostos a hortaliças cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos de carvão**. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, 2012.

GRASSI, J. P. **Genotoxicidade em tecido hepático e sanguíneo de camundongos tratados com *Baccharistrimera* (Less.) Dc. de ocorrência em solo degradado pela**

**mineração de carvão a céu aberto, Treviso, Santa Catarina.** 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) –Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. 2007.

GUO L.; YANG, J. Y.; WU, C. F. Oxidative DNA Damage Induced by Ethanol in Mouse Peripheral Leucocytes. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, p. 1742-7843. 2008.

HEDDLE J.A. **A rapid in vitro test for chromosomal damage.** **Mutation Research.**, v. 18, p. 187-190, 1973.

HENDRIKS, A. J.; MA, C. W.; BROUNS, J. J.; de RUITER-DIJKMAN, E. M.; GAST, R. **Modelling and monitoring organochlorine and heavy metal accumulation in soils, earthworms, and shrews in Rhine-delta floodplains.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Letystad, v. 29, p. 115-127, 1995.

HORBACH, R., KUCK, L., MARIMON, R. G. et al. **Geologia.** In: Fundação instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE). Levantamento de Recursos Naturais: v. 33. Folha SH. 22 Porto Alegre e parte das folhas SH. 21 Uruguaiana e SI. 22 Lagoa Mirim. Rio de Janeiro: IBGE, 1986, p. 29-294.

INTERNATIONAL Energy Agency. Energy technology perspectives. (IEA), **Head of Communication and Information Office, 9 rue de la Fédération, 75739 Paris Cedex 15,** França, 2008. Disponível em: <[http://www.iea.org/techno/etp/etp\\_2008\\_exec\\_sum\\_english.pdf](http://www.iea.org/techno/etp/etp_2008_exec_sum_english.pdf)>. Acesso em: 12 mar. 2013.

KHAMISY, S. F. E.; CALDECOTT, K. W. **TDP1-dependent DNA single-strand break repair and neurodegeneration.** Mutagenesis, vol. 21, n. 4, p. 219-224, jun. 2006.

KLEIN, A. S. **Áreas Degradadas pela Mineração de Carvão no Sul de Santa Catarina: Vegetação Versus Substrato.** Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Criciúma. 87 f. 2006.

LAUERMANN, A. **Caracterização química dos efluentes gerados pelo aterro controlado de Santa Maria e retenção de chumbo e zinco por um argissolo da depressão central do Rio Grande do Sul.** Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 72 f.; 2007.

LEFFA, D. D. **Avaliação do Potencial Genotóxico do Rejeito de Carvão Mineral através do Molusco *Helix aspersa* (Müller, 1774).** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. 55 f.; 2008.

LEFFA, D. D.; DAMIANI, A. P.; SILVA, J.; ZOCHE, J. J.; SANTOS, C. E. I.; BOUFLEUR, L. A.; DIAS, J. F. ANDRADE, V. M. Evaluation of the genotoxic potential of the mineral coal tailings through the *Helix aspersa* (Müller, 1774). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Criciúma, v. 59, n. 4, p. 614-621, abr. 2010.

LEFFA, D.; D. ANDRADE, V. M. Potencial genotóxico de metais em áreas mineradas de carvão. **Revista de Pesquisa e extensão em saúde**. Universidade do Extremo Sul Catarinense, v. 4, n. 1, 2008.

LEFFA, D.D. et al. **Evaluation of the Genotoxic Potential of the Mineral Coal Tailings Through the *Helix aspersa* (Müller, 1774)**. Arch Environmental Contamination Toxicology, v. 59, n. 4, p. 614-621, 2010.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. **Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição**. Revista Brasileira de Nutrição Clínica, São Paulo, v. 18, p. 87-94, jun. 2003.

LEÓN, G.; PÉREZ, L. E.; LINARES, J. C.; HARTMANN, A.; QUINTANA, M.. **Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an opencoal coal mining area**. Mutation Research. v. 630, p. 42-49, 2007

LOPES, R.P.; SANTOS, E. L.; GALATTO, S.L. **Mineração de carvão em SC: geologia, geoquímica e impactos ambientais**. Curitiba: Jurerá Editora, 2009.

LUCAS, G. **Star Wars V: The Empire Strick Back**. Lucasfilm, E.U.A., 1980.

MANOEL, Luana Fernandes. . **Aplicabilidade de análise toxicológica e nucleásica para o monitoramento do biopolimento de efluente de mineração**. 2009. 54 f. TCC (Curso de Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2009.

MARTINS, A. A. **Sócio-economia do carvão em Santa Catarina: uma contribuição ao estudo de sua trajetória**.Dissertação (Mestrado em Economia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 186 f.; 2005.

MAVOURNIN, K. H.; BLAKEY, D. H.; CIMINO, M. C.; SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A. **The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood.A report of the U.S. Environmental Protection Agency**. Gene-Tox Program. MutationResearch, OakRidge, v. 239, p. 29-80, jul. 1990.

MEIRELES, J. R., **Avaliação genotóxica de esteróides anabolizantes sintéticos com uso do teste de micronúcleo em medulla óssea de camundongos (*Mus musculus*)**. Tese de Doutorado (Biotecnologia)-Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA. 65 f; 2012.

MEJÍA, G. L. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e citogenéticos na população de trabalhadores de mineração de carvão de Cerrejón (Guajira – Colômbia) utilizando diferentes biomarcadores**. [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre/RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

MILIOLI, G.; SANTOS, R. dos.; ZANETTE, V.C. **Mineração de carvão, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no sul de Santa Catarina**. Curitiba: Juruá, p. 315, 2009..

MINISTÉRIO PÚBLICO FEDERAL. Procuradoria da República no Município de Criciúma-SC. **Informação no 003/2006 ACP nº 2000.72.002543-9. Meio Ambiente. Carvão mineral. Reparação de danos ambientais em áreas mineradas na Bacia Carbonífera do Sul do Estado de Santa Catarina (Período básico: 1972-1989)**.

MONTALVOS, M. C.; VERBEL, J. O.; ALDANA, H. C. **Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia.** Science of the Total Environment, 2011.

PARAÍBA, L. C.; BOEIRA, R. C.; JONSSON, C. M.; CARRASCO, J. M. **Fator de bioconcentração de poluentes orgânicos de lodos de esgoto em frutos de laranja.** Pesticidas: revista ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba, v. 16, p. 125-134, 2006.

PERALBA, M. C. R. **Caracterização química dos hidrocarbonetos de betumes de carvões sul-brasileiros.** Dissertação (Doutorado)- Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 126 f.;1990.

PRMC – PROCURADORIA DA REPÚBLICA NO MUNICÍPIO DE CRICIÚMA – SC. Ministério Público Federal. Informação Técnica nº 003/2006. Criciúma: Comissão Técnica de Assessoramento da PRMC. mar. 2006. Disponível em: [https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/conteudo/levantamento\\_minas/mineracao\\_acp.htm](https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/conteudo/levantamento_minas/mineracao_acp.htm). Acesso em: 03 jul. 2012.

RIBEIRO, L. R.(org.); SALVADORI, D. M. F; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental.** 1ª ed. ULBRA editora, Canoas, RS, 2003.

RUBIO, J.; OLIVEIRA, C.; SILVA, R. **Aspectos ambientais nos setores mineiro e metalúrgico.** In: LUZ, A. B. (Org.); SAMPAIO, J. A. (Org.); FRANÇA, S. C. A. (Org.). **Tratamentos de minérios.** 5. ed. Rio de Janeiro: CETEM, 2010. p. 751-793.

RUSH, T.; HJELMHAUG, J.; LOBNER, D. **Effects of chelators on mercury, iron, and lead neurotoxicity in cortical culture.** NeuroToxicology. v. 30, p. 47-51, 2009.

SALAMONE, M.; HENDDLER, J.; STUART, E.; KATZ, M. . **Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene.** Mutation Research, v. 74, n. 5, out. 1980.

SANCHEZ, J.C.D. ; FORMOSO, M.L.L. **Utilização do carvão e meio ambiente.** Porto Alegre: CIENTEC, 1990.

SÁNCHEZ-CHARDI, A.; MARQUES, C. C.; GABRIEL, S. I.; CAPELA-SILVA, F., CABRITA, A. S.; LÓPEZ-FUSTER, M. J.; NADAL, J.; MATHIAS, M. L. **Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*.** Environ Pollut, v. 156, p. 1332-1339, 2008.

SANTOS, R.; CITADINI-ZANETTE, V.; LEAL FILHO, L. S.; KLEIN, A. S.; MARTINS, R.; REMOR, R. **Composição florística e estrutura fitossociológica de um fragmento de floresta ombrófila densa, como subsídio para reabilitação de ecossistemas degradados, Região Carbonífera Catarinense, Brasil.** In: XX ENCONTRO NACIONAL DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS E METALURGIA EXTRATIVA, 10., jun. 2004, Florianópolis. Anais...Florianópolis: Universidade do Extremo Sul Catarinense, jun. 2004. p. 663-671.

SHINS, R. P. F.; SCHILDERMAN P. A. E. L.; BORM, P.J.A. **Oxidative damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers.** Int Arch Occup Environ Health, v. 67, p. 153–157, 1995.

SILVA, J. ; FREITAS, T. R. O; MARINHO, J. R.; SPEIT, G; ERDTMANN, B. **An alkylene single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents.** Genetics and Molecular Biology, v. 23, p. 241-245, 2000.

SILVA, J. da; FREITAS, T. R. O. de; HEUSER, V.; MARINHO, J. R.; BITTENCOURT, F.; CERSKI, C. T. S.; KLIEMANN, L. M.; ERDTMANN, B. **Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues.** Mutation Research, v. 470, p. 39-51, 2000.

SILVA, T. C. **Avaliação de risco à saúde humana considerando os metais presentes em corpos d'água situados nas proximidades do rio Sangão, Forquilha, SC.** TCC (Curso de Engenharia Ambiental)- Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC. 215 f., 2011.

SIMMONS, S. O.; FAN, C.Y., YEOMAN; WAKERFIELD, J.; RAMABHADHAN, R. **NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent.** Current Chemical Genomics, v. 5, p. 1-12, 2011.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Experimental Cell Research, New York, v. 175, p. 184-191, mar. 1988.

SKOUSEN, J.; ROSE, A. GEIDEL, G.; FORUMAN, J.; EVANS, R.; HELLIER . **A handbook of technologies for avoidance and remediation of acid mine drainage.** West Virginia University and the National Mine Land Reclamation Center, 1998.

SOARES, C. R. F. S.; ACCIOLY, A. M. A.; MARQUES, T. C. L. L. S. M.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. **Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Lavras, v. 13, p. 302-315, out. 2001.

SOARES, E.R.; MELLO, J. W. V.; SCHAEFER, C. E. G. R.; MARCIANO, L. . **Cinza e carbonato de cálcio na mitigação de drenagem ácida em estéril de mineração de carvão.** Revista Brasileira de Ciência e Solo, v. 30, p. 171-181, 2006.

SOUZA, T.S. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo, utilizando *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) como organismo-teste.** Dissertação de Mestrado (Biologia celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista - UNESP. São Paulo,SP. 2005.

STEIN, R. J. **Excesso de ferro em arroz (*Oryza sativa* L.): efeitos tóxicos e mecanismos de tolerância em distintos genótipos.** Tese de Doutorado (Biologia celular e Molecular)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 197 F.; 2009.

TICE, R. R. **Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants.** In: BUTTERWORTH, B. E.; CORKUM, L. D.; GUZMÁN-RINCÓN, J. (Ed.). Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. New York: Plenum Press. p. 69-79, 1995.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. **Single cell**

**gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.**

Environmental and Molecular Mutagenesis, North Carolina, v. 35, p. 206-221, 2000.

UNIFENAS. *Mus musculus*, disponível em:

<http://www.unifenas.br/pesquisa/bioterio/animais.asp>. Acesso em: 27 de maio de 2013.

VILELLA, I. V. **Avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais da região hidrográfica da bacia do lago Guaíba.** Tese de Doutorado ( Biologia Celular e Molecular)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.153 f. 2006.

VILLELA, I.V.; DE OLIVEIRA, I. M.; DA SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. **DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants.** Mutation Research, v. 605, p. 78-86, 2006.

WALKER, L. A.; BAILEY, L. J.; SHORE, R. F. **The importance of the gut and its contents in prey as a source of cadmium to predators.** Environmental Toxicology and Chemistry, Huntingdon, v. 21, p. 76-80, jan. 2002.

ZOCHE, J. J. **Comunidades Vegetais de Savana Sobre Estruturas Mineralizadas de Cobre na Mina Volta Grande, Lavras do Sul, RS.** 205 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002.

ZOCHE, J. J. ; LEFFA, D.D. ; DAMIANI, A.P. ; CARVALHO, F. ; MENDONÇA, R. Á; SANTOS, C.E.L. ; BOUFLEUR, L.A. ; DIAS, J.F. ; ANDRADE, V. M. **Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of catarinense coal basin, Brazil.** Environmental Research (New York, N.Y.). 2010 (in press).

ZOCHE, J. J. ; PORTO, M. L. **Ecologia de Paisagem na microbacia do Arroio Camaquã das Lavras, Lavras do Sul, RS: uso, cobertura do solo e distribuição de associações vegetais na Savana Metalófila.** In: PORTO, M. L. (Org.). **Comunidades vegetais e fístossociologia: Fundamentos para a avaliação e manejo de ecossistemas.** 1. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2008, v. 1, p. 195-220.

ZOCHE, J. J. **Efeitos da mineração de carvão sobre os morcegos no sul de Santa Catarina: a presença de metais pesados e a ocorrência de danos celulares.** In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOOLOGIA, 4, 2008, São Lourenço - MG. **Anais...** São Lourenço: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008. p. 1-10.

ZOCHE, J. J. **Metais pesados (Fe, Mn e Zn) no solo construído e na vegetação das antigas bacias de decantação do lavador de Capivari, Capivari de Baixo, SC.** In: SIMPÓSIO NACIONAL E CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 6., 2005, Curitiba. **Anais...** Curitiba: SOBRADE, 2005. p. 117-124.

ZOCHE, J. J.; FREITAS, M.; QUADROS, K. E. **Concentração de Zn e Mn nos efluentes do beneficiamento de carvão mineral e em *Typhadomingensis* PERS (Typhaceae).** Revista Árvore, Viçosa, v. 34, p. 1077-1088, 2010.

ZOCCHÉ, J. J.; PORTO, M. L. **Florística e fitossociologia de campo natural sobre banco de carvão e áreas mineradas, Rio Grande do Sul.** Acta Botânica Brasílica, v. 6, n. 2, p. 47-84, 1993.

ZOCCHÉ-DE-SOUZA, P.; COSTA, S.; ZOCCHÉ, J. J. ***Baccharis trimera* Less. DC. como indicadora da recuperação de áreas mineradas de carvão.** Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, p. 702-704, jul. 2007.