

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

**POTENCIAL GENOTÓXICO DE *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D. C.
CULTIVADA EM ÁREA DE EXPLOTAÇÃO DE CARVÃO, NO EXTREMO SUL
CATARINENSE**

Karina de Oliveira Teixeira

Criciúma, SC

2013

KARINA DE OLIVEIRA TEIXEIRA

**POTENCIAL GENOTÓXICO DE *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D. C.
CULTIVADA EM ÁREA DE EXPLOTAÇÃO DE CARVÃO, NO EXTREMO SUL
CATARINENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas da Universidade do Extremo Sul
Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof^a Dra. Vanessa Moraes de
Andrade

CRICIÚMA, SC

2013

KARINA DE OLIVEIRA TEIXEIRA

**POTENCIAL GENOTÓXICO DE *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D. C.
CULTIVADA EM ÁREA DE EXPLOTAÇÃO DE CARVÃO, NO EXTREMO SUL
CATARINENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Genética Toxicológica Ambiental.

Criciúma, 28 de junho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Vanessa Moraes de Andrade – Doutora – (UNESC) – Orientadora

Prof^a Maria Julia F. Corrêa Angelôni – Mestre – (UNESC)

Prof^o Tiago Moreti – Mestre – (UNESC)

Com muito amor e carinho dedico aos meus pais, Luiz e Eliane, que são os meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me guia e me dá força para enfrentar todos os obstáculos.

Aos meus pais, **Luiz** e **Eliane**, por serem a essência do que eu sou, por serem meus maiores incentivadores (moral e financeiramente) e por sempre estarem comigo quando eu precisei.

Aos meus irmãos **Gabriela**, **Luca** e **Camilla**, simplesmente por existirem, pois sem eles eu não seria nada do que sou.

Ao meu namorado **João Leonardo**, por todo o amor que me dedica e me aturar mesmo quando eu estava estressadíssima com todas as coisas para fazer.

A minha orientadora **Vanessa**, por me aceitar em seu laboratório e me dar a chance de mostrar meu trabalho.

A **Maielen** e ao **Victor Hugo**, pela amizade e por me ajudarem com todo o trabalho do TCC, sem eles teria sido muito mais difícil.

Aos meus amigos que sempre estiveram juntos comigo, em especial a **Gabriela**, que nunca teve medo de se expressar e falar o que pensa e que muito me ajudou neste experimento; a **Ana Paula**, que me conquistou com seu super-ego, e sempre esteve pronta quando mais precisei dela; ao **Gustavo**, que sempre me fez sorrir com seu jeito brincalhão e que não deixava eu dormir nas aulas.

Aos meus professores que me passaram conhecimento e se dedicaram para que eu pudesse me tornar uma profissional qualificada.

A todo o pessoal do **LABIM** que já estavam lá quando eu cheguei e que me ensinaram e me ajudaram com muita paciência, e aqueles que chegaram depois e eu pude contribuir de alguma forma, em especial a **Daniela**, a **Adriani**, a **Francine**, a **Maiara**, a **Marina**, o **Renato**, a **Ana Luiza**, e a **Luiza**.

Aos animais que contribuíram e aos que contribuirão com a própria vida para que muitas doenças sejam evitadas e outras curadas.

E a todos os que de alguma forma estiveram presentes em minha vida e que com certeza deixaram alguma marca em mim.

"São nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos – Profº Dumbledore." (ROWLING, J. K., 2000).

RESUMO

A mineração de carvão começou por volta da década de 40 e tem causado desde então alterações físicas, químicas e biológicas nos ecossistemas locais. A exploração de carvão gera quantidades significativas de rejeitos potencialmente poluidores que a pouco tempo atrás eram oferecidos a população como aterro, onde era depositado por cima uma camada tênue de argila para construção de moradias. Com elas veio o plantio e consumo de hortaliças, as quais podem apresentar um risco genotóxico potencial. Com a resolução do CONAMA/86, passou a ser normatizado o descarte desses rejeitos, porém o seu uso ainda é incerto, devido a possibilidade dos elementos tóxicos poderem migrar no perfil do novo solo. Vários efeitos adversos, como a genotoxicidade, são atribuídos aos metais pesados. Acredita-se que o consumo dessas hortaliças representa riscos à saúde humana. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genotóxico de folhas de couve cultivadas em área de rejeitos da exploração do carvão em camundongos. A hortaliça usada foi a *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C., cultivada sobre um antigo depósito de rejeito da exploração do carvão (experimental) e cultivada de modo orgânico (controle). O suco da couve foi produzido em um processador de frutas sem adição de água. Foram realizados 2 testes o Ensaio Cometa (EC) (avaliando os parâmetros Índice e Frequência de Dano (ID e FD)) e o Teste de Micronúcleos (MN). Foram utilizados 42 camundongos, divididos em grupos: Controle Negativo – água (CN), Suco de Couve Orgânica (SCO) e Suco de Couve da Mina (SCM), com uma única administração dos sucos, no tratamento agudo, com coletas de sangue em 3, 6 e 24 h após para o EC, e posterior morte dos animais para retirada do fígado e córtex para o EC e medula óssea para o MN e o tratamento crônico com os mesmos grupos mais um para análise de processo de reparo com administração contínua dos sucos por 30 dias, com coletas de sangue em 2, 5, 10, 20 e 30 dias para o EC, e posterior morte dos animais dos grupos CN, SCO e SCM para a retirada do fígado e do córtex para o EC e medula óssea para o MN. Foi realizado coletas de sangue em 24 h e 3 dias após o término do tratamento do grupo SCM reparo para verificar o sistema de reparo. No EC agudo o grupo SCM apresentou diferença significativa em relação ao grupo CN e SCO com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey) em todos os tempos e estruturas em ambos os parâmetros, exceto o fígado que não diferiu na FD do grupo SCO. No EC crônico o grupo SCM diferiu dos grupos CN e SCO com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey) em todos os tempos em ambos os parâmetros exceto o tempo de 30 dias que obteve $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey). As estruturas não apresentaram diferenças significativas. No MN não obtivemos diferenças significativas em ambos os tratamentos. Portanto concluímos que o consumo dessa hortaliça deve ser feito com cautela devido ao potencial genotóxico apresentado.

Palavras-chaves: *Brassica oleracea*. Genotoxicidade. Ensaio Cometa. Teste de Micronúcleos. Couve-folhas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Animal utilizado no experimento.	15
Figura 2 - Localização da Unidade Minerária II da Carbonífera Criciúma S.A.....	16
Figura 3 – Suco utilizado no tratamento.....	17
Figura 4: Marcação dos animais para diferenciação individual.....	18
Figura 5 - Imagem dos danos avaliados através do Ensaio Cometa.....	19
Figura 6 - Análise de micronúcleos.....	20
Figura 7 – Comparativo dos danos em DNA causados pelo suco de couve cultivada em área de rejeito da exploração de carvão em diferentes horas de exposição avaliadas de forma aguda através do Ensaio Cometa.....	24
Figura 8 – Avaliação do reparo de células sanguíneas de camundongos expostos ao tratamento crônico com suco de couve cultivada em área de rejeito de carvão.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Detecção de danos em DNA de sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma aguda ao suco de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve-folha) cultivada em área de exploração de carvão, usando o Ensaio Cometa.....23

Tabela 2: Detecção de danos em DNA de sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma crônica ao suco de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve-folha) cultivada em área de exploração de carvão, usando o Ensaio Cometa.....26

Tabela 3: Avaliação da mutagenicidade em camundongos expostos e não expostos ao tratamento de forma aguda e crônica ao suco de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (Couve-folha) cultivada em área de exploração de carvão, usando o Teste de Micronúcleos em medula óssea.....28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo geral.....	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2 METODOLOGIA	15
2.1 ANIMAIS E COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA	15
2.2 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	15
2.3 HORTALIÇAS E PREPARO DA AMOSTRA.....	16
2.4 DESENHO EXPERIMENTAL	17
2.5 ENSAIO COMETA.....	18
2.6 TESTE DE MICRONÚCLEO (MN) EM MEDULA ÓSSEA.....	20
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
3 RESULTADOS	22
3.1 ENSAIO COMETA AGUDO	22
3.2 ENSAIO COMETA CRÔNICO.....	24
3.3 TESTE DE MICRONÚCLEOS.....	27
4 DISCUSSÃO	29
5 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

As reservas brasileiras conhecidas de carvão mineral chegam a um total de 32 bilhões de toneladas *in situ* ocorrendo predominantemente nos domínios geológicos da bacia do Paraná, na região sul do País (HORBACH et al., 1986; DNPM, 2008).

No Brasil a descoberta do carvão ocorreu nos três estados do Sul, mas foi em Santa Catarina que esta descoberta provocou modificações profundas no ambiente (MARTINS, 2005).

A Bacia Carbonífera Catarinense está localizada no sudeste do estado, abrangendo uma área de 1850 km², ocupando uma faixa entre os paralelos 28°48'25" e 28°23'54" e meridianos 49°33'38" e 49°15'11" de 95 km de comprimento e 20 km de largura (HORBACH et al., 1986). A extração de carvão começou nesta região por volta de 1940 (CETEM, 2001) e tem causado desde então alterações físicas, químicas e biológicas nos ecossistemas locais, comprometendo diretamente os recursos do solo, água e biota (COSTA et al., 2007; ZOCHE-DE-SOUZA et al., 2007) em uma área de aproximadamente 20.500 ha (PRMC, 2006).

O carvão de Santa Catarina se destaca por ser o único encontrado na região Sul do Brasil que além de servir como fonte de energia para usinas termoelétricas, é coqueificável, ou seja, pode ser usado na produção de aço (MARTINS, 2005).

Apesar de ser uma importante atividade econômica os impactos ambientais gerados são de grande magnitude, com uma produção bruta média de 720.000 ton/mês de ROM (*Run off Mine*) na Região Carbonífera Catarinense, recupera-se uma média de 36% do carvão bruto após o processo de beneficiamento, gerando aproximadamente 460.800 ton./mês de rejeitos sulfetados (pirita, marcassita, pirolusita e calcopirita) (DNPM, 2007). Estes minerais possuem um poder calorífico mais baixo do que o carvão e por produzirem durante a combustão uma grande quantidade de SO_x, são classificados como rejeitos (DE FAVERI et al., 2009; DA SILVEIRA et al., 2009). Além da produção de rejeitos a lavra a céu aberto descaracteriza os solos, deixando no local uma mistura dos horizontes do solo com a rocha matriz e outros materiais inerentes que puderem existir sobre a camada do carvão, sendo esta mistura chamada de estéreis de carvão (SANTOS et al., 2004). Como se pode observar a exploração do carvão

(extração, beneficiamento e comercialização) gera quantidades significativas de rejeitos potencialmente poluidores (ZOCHE, 2008) que são geralmente acumulados em módulos a céu aberto, contribuindo para a oxidação da pirita e para a solubilização de metais pesados no solo (FERREIRA et al., 2003). Na região a poluição do ar, associada à atividade de mineração do carvão, ocorre principalmente como consequência do manuseio de material particulado e da geração de SO_x a partir da combustão espontânea que ocorre nos depósitos do rejeito (CETEM, 2001).

A poluição proveniente das emissões de material particulado no ambiente atmosférico ocasiona inúmeros impactos ambientais como a redução da visibilidade, desequilíbrios estéticos sobre as casas, corrosão de metais, impactos na qualidade das águas e na vida aquática, e danos à saúde humana ocasionados por enfermidades respiratórias, alergias, reações tóxicas, entre outras (RUBIO et al., 2010).

Além disso, as atividades de extração liberam uma grande quantidade de poluentes na atmosfera, cinzas, produtos da liquefação e combustão do carvão contêm Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP), onde vários HAPs possuem atividades mutagênicas e carcinogênicas (PERALBA, 1990).

Antigamente os rejeitos eram depositados ao redor das minas, mas com o aumento da produção foram sendo depositados em qualquer local, sem a menor preocupação com o ambiente. Por ser um material a ser descartado, era oferecido a população como aterro, levando a um grande depósito nas periferias urbanas inclusive em áreas baixas e alagáveis. Os loteamentos, com a expansão urbana, foram avançando sobre estas áreas que eram destinadas as populações de baixa renda. Para a construção de moradias era depositada uma camada tênue de argila de 0,2 a 0,3 m, e que foi sendo aos poucos desgastada pela erosão hídrica. Com as construções das moradias veio o plantio e consumo das hortaliças, as quais podem apresentar um risco genotóxico em potencial pelo fato de terem contato direto, por meio de suas raízes, com os metais tóxicos e mutagênicos presentes nos rejeitos, e contato indireto pelo ar das hortaliças que ficam próximas as minas e áreas de rejeitos a céu aberto. Um fato agravante nesta situação é que a maioria das espécies vegetais que crescem nesses solos não consegue evitar a absorção dos metais pesados, somente limitar a sua translocação (BROOKS, 1983; ZOCHE; PORTO, 1993; SOARES et al., 2001; ZOCHE, 2002; ZOCHE; PORTO, 2008).

Somente com a Resolução do CONAMA 001/86 (BRASIL, 1986) a Legislação Brasileira passou a normatizar o descarte de rejeitos da mineração, porém mesmo sendo depositado de modo controlado o uso futuro dessas áreas ainda é incerto, pois os elementos tóxicos presentes podem migrar no perfil do novo “solo construído”, já que a camada de argila depositada sobre os rejeitos é pouco espessa (LAUERMANN, 2007).

Várias espécies de plantas são conhecidas como concentradoras ou acumuladoras de metais pesados (BROOKS, 1983), que ao serem absorvidos e metabolizados pelas plantas tornam-se disponíveis aos animais que as ingerem (HENDRKS et al., 1995; WALKER et al., 2002). O acúmulo de metais pesados e outros poluentes por organismos têm efeito bastante abrangente, já que existe o transporte dos contaminantes nos diversos níveis tróficos da cadeia alimentar, fazendo com que os predadores apresentem as maiores concentrações (BROWN, 1975).

Efeitos adversos em sistemas biológicos, tal como genotoxicidade, tem sido atribuídos aos metais pesados (PARAÍBA et al., 2006), já que o excesso de metais pesados pode estimular a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) (BENAVIDES et al., 2005). Os efeitos nocivos das reações de oxidação induzidas pelos radicais livres são capazes de lesar estruturas dos sistemas biológicos, dando-se o nome de estresse oxidativo (LEITE; SARNI, 2003). Nos organismos os principais mecanismos relacionados com a genotoxicidade provocada por metais pesados são o estresse oxidativo, a inibição dos sistemas de reparo, ativação da sinalização mitótica e mudanças na modulação dos genes (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008).

Populações humanas que vivem sobre ou próximas às áreas mineradas de carvão e não recuperadas utilizam ervas medicinais, utilizam pastagens para alimento de gado, utilizam os recursos hídricos para a produção de arroz e cultivam hortas domésticas. Apesar de existirem diversos estudos que tratam da interação solo-metais pesados, e metais pesados-plantas (ZOCHE, 2005; COSTA et al., 2007; FREITAS et al., 2007; ZOCHE-DE-SOUZA et al., 2007; ZOCHE et al., 2010), há poucos estudos que tratem dos efeitos deletérios dos metais pesados aos humanos (WALKER et al., 2002; CONSTANTINO, 2007; ZOCHE, 2008; GRASSI, 2007; LEFFA et al., 2010; DAMIANI, 2010), assim o uso destas áreas deve ser feito com cautela, já que ainda não foram devidamente avaliados os efeitos deletérios

causados pela presença de elementos tóxicos no substrato e sua consequente biomagnificação à saúde humana.

Monitorar o impacto ecológico e os riscos à saúde humana é problemático, principalmente devido à complexidade e ao custo decorrente da identificação das substâncias químicas envolvidas. Além disso, é complexo fazer uma ligação entre a presença de elementos tóxicos e a saúde humana, já que os humanos diferentemente dos animais silvestres movem-se muito e sua dieta, incluindo a água que bebem, não são necessariamente oriundos de um mesmo local (BROOKS, 1983). Adicionalmente, se constitui um problema o fato de que os organismos na natureza não estão expostos a um único composto, mas sim a uma complexa mistura de compostos, fazendo com que técnicas analíticas não informem muito no que diz respeito à extrapolação a danos biológicos, assim como estudos epidemiológicos falham na determinação do tempo e condição de exposição, além de ser necessário um longo período de exposição para que algumas doenças se expressem (TICE, 1995).

Podemos, portanto, desenvolver de forma indireta a investigação dos riscos deletérios a que a população humana está exposta, por meio de estudos com outros organismos de topo de cadeia, por meio da avaliação de danos genotóxicos que fornecerão uma indicação da contaminação da cadeia alimentar, ou de outra forma expor um modelo animal aos alimentos consumidos por humanos, provenientes de áreas degradadas pela mineração de carvão (ZOCHE, 2005). Nesse sentido a exposição de camundongos a hortaliças produzidas sobre depósitos controlados de rejeitos da exploração do carvão oferecem oportunidade ímpar de testar as hipóteses aqui levantadas.

Para avaliar os danos à constituição genética foram criados vários testes que avaliam de diferentes maneiras o resultado das interações destes agentes com o DNA, destacando-se entre eles o Teste do Micronúcleo e o Teste Cometa que analisa o índice e a frequência de danos ao DNA. Neste teste, o dano é verificado quando fragmentos do DNA migram do núcleo da célula, podendo assim, obter a informação de lesões que ocorrem *in vivo*. É uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA (FAIRBAIRN et al., 1995; SINGH et al., 1988). Já o teste de Micronúcleo avalia danos não mais passíveis de reparos, ou seja, mutações no DNA em células de medula óssea de roedores (MAVOURNIN et al., 1990).

Sendo assim este trabalho fundamenta-se na hipótese de que o consumo de hortaliças cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos da mineração e do beneficiamento do carvão representa riscos à saúde humana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial genotóxico de folhas de couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.) cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos da exploração do carvão em células sanguíneas, hepáticas, córtex e medula óssea de camundongos.

1.1.2 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 folhas de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve-folhas) cultivadas sobre depósitos de rejeitos da exploração do carvão;
- Verificar a possibilidade de reparo dos danos causados em células sanguíneas de camundongos expostos a alimentação com suco de folhas de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve-folhas) cultivadas sobre depósitos de rejeitos da exploração do carvão;
- Avaliar a mutagenicidade do suco de folhas de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve-folhas) 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 42 camundongos Swiss, machos, adultos, provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), foram mantidos num ciclo claro-escuro de 12 horas, água e comida oferecidas *ad libitum*. Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, segundo o n° de protocolo 110/2011.



Figura 1 – Animal utilizado no experimento.
Fonte: Autor

2.2 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado 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 (Figura 2). A horta foi construída sobre um antigo depósito de rejeito da exploração do carvão. Segundo informação pessoal do Eng°. Schneider, 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 espalhado 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 2 - Localização da Unidade Minerária II da Carbonífera Criciúma S.A.
Fonte: Google Maps (2012).

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 era cultivada o ano inteiro e as hortaliças destinadas a alimentação dos funcionários.

2.3 HORTALIÇAS E PREPARO DA AMOSTRA

A hortaliça utilizada foi a *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve-folhas), fornecida pelo senhor Pedro Alcino Budny, cultivada no município de Içara, SC de modo orgânico certificado (controle), e cultivada sobre depósito controlado de rejeito da exploração do carvão (experimental). O modelo animal de exposição à hortaliça se deu por meio de gavagem com o suco da folha processado em um processador de frutas, onde foram colocadas aproximadamente 100 g de folhas para um rendimento médio de 50 mL de suco sem posterior adição de água, cada tratamento foi administrado para um grupo composto de seis indivíduos em uma dose de 0,1 mL/10 g de peso corporal.



Figura 3 – Suco utilizado no tratamento.
Fonte: Autor

2.4 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado através da administração de água destilada (H_2O_d) e suco das folhas. Os animais foram divididos em 7 grupos em dois tratamentos distintos conforme descrito a seguir:

- Tratamento Agudo: Uma única administração dos sucos ou controles com coletas de sangue em 3 h, 6 h e 24 h, por incisão na veia caudal.

Grupo 1 – controle negativo – H_2O_d ;

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

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

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

- Tratamento Crônico: Administração contínua dos sucos ou água uma vez ao dia por 30 dias com coletas de sangue em 2, 5, 10, 20 e 30 dias, por incisão na veia caudal.

Grupo 1 – controle negativo – H_2O_d ;

Grupo 2 - suco de folha de couve cultivada de modo orgânico;

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

Grupo 4 - suco de folha de couve cultivada sobre depósito controlado de rejeito da exploração do carvão (grupo reparo).

Após 24 horas da última administração foi coletado sangue por incisão da veia caudal para o ensaio cometa, os animais (exceto grupo 4) foram mortos por deslocamento cervical, e foram coletados o fígado e o córtex para o ensaio cometa e a medula óssea para o teste de micronúcleo, foram realizadas coletas de sangue por incisão da veia caudal do grupo 4 com 24 horas e 3 dias após a última administração dos sucos para avaliação do sistema de reparo.



Figura 4: Marcação dos animais para diferenciação individual.

Fonte: Autor

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 μL de sangue com 95 μL de agarose Low Melting Point (0,75%). Coloca-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 são 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 são incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para que ocorra o desenovelamento do DNA. Realiza-se a corrida

eletroforética a 25 V e 300 mA por 15 minutos. Todas as etapas ocorrem sob luz indireta. Logo após, as lâminas são neutralizadas com 0,4 M Tris (pH 7,5) (COLLINS, 1999) e, ao final, o DNA é corado com nitrato de prata, onde logo após as lâminas estiverem secas são hidratadas com água destilada (H₂O_d) por 5 min., em seguida, no escuro, adicionou-se à cubeta com as lâminas previamente hidratadas a solução uso composta por 44,7 mL A + 25,3 mL B (A = 50 g de Na₂CO₃ completar até 1000 mL de H₂O_d; B = 0,5 g de NH₄NO₃ + 0,5 g de AgNO₃ + 1,28 g de H₄O₄₀SiW₁₂ + 750 µL de CH₂O completar até 500 mL de H₂O_d), e levada ao banho-maria a 37° C por 20 min., passado este tempo retirou-se a cubeta do banho e deixou-se por 20 min. em temperatura ambiente, após retirou-se a solução da cubeta e em seguida adicionou-se a solução STOP (10 mL de C₂H₄O₂, completar até 1000 mL de H₂O_d) por 5 min., retirou-se a solução da cubeta e lavou-se as lâminas 1 vez em H₂O_d, e deixou-se secar para análise em microscópio óptico.

Foi realizada 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 x 0 = 0; 100 células observadas sem dano) a 400 (100 x 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a Frequência de Dano (FD em %) em cada amostra com base no número de células com caudas vs. P número de células sem cauda (COLLINS, 1999).

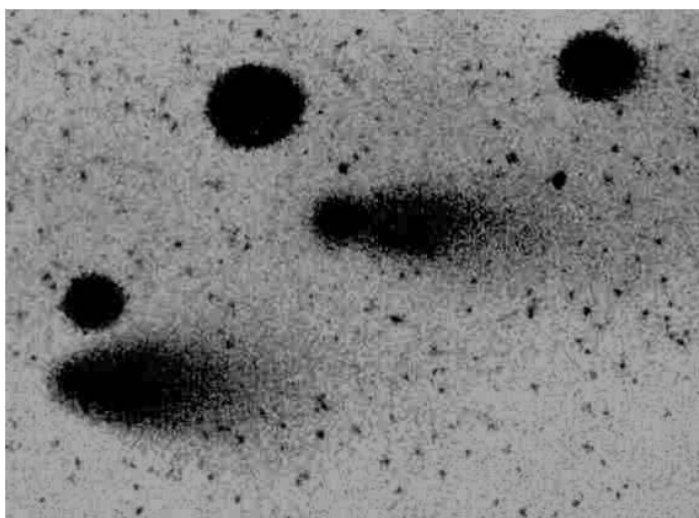


Figura 5 - Imagem dos danos avaliados através do Ensaio Cometa.

Fonte: Autor

2.6 TESTE DE MICRONÚCLEO (MN) EM MEDULA ÓSSEA

Foi realizado segundo os protocolos de padrão internacional (MAVOURNIN et al., 1990). Após a morte, retira-se a medula óssea do fêmur do camundongo com o auxílio de uma agulha histológica. Com este material são 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 são 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) para o tratamento agudo. Para o tratamento crônico foram analisados 2000 EPCs e 2000 ENCs por animal, sendo a detecção dos efeitos de citotoxicidade realizada através da contagem de EPCs em relação aos ENCs em 100 células (EPC/ENC).

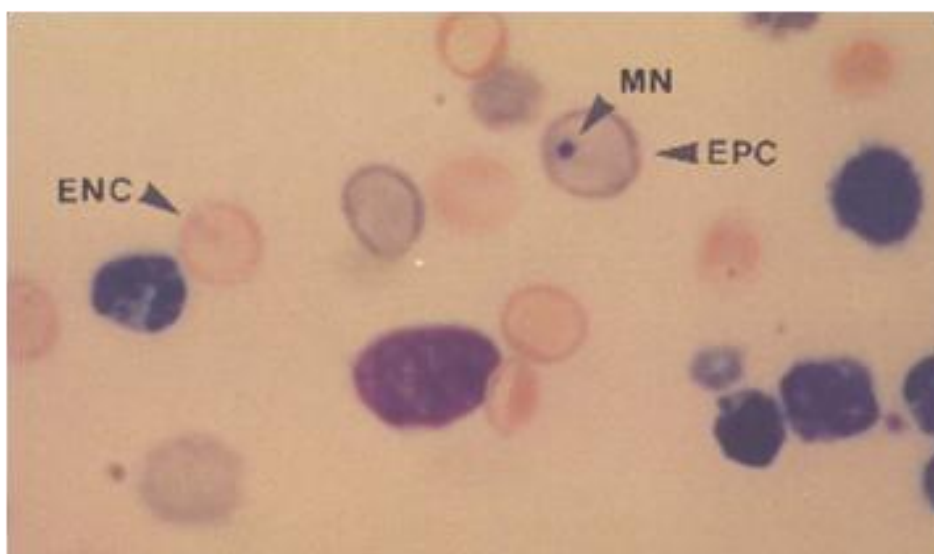


Figura 6 - Análise de micronúcleos.
Fonte: Vanessa Moraes de Andrade

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. Todas as análises foram

realizadas utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0 (MAMIRAUÁ, 1999). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 ENSAIO COMETA AGUDO

O Ensaio Cometa em sangue periférico no tratamento agudo foi realizado nos seguintes tempos de exposição 3, 6 e 24 horas após a ingestão do suco de couve sendo avaliados o Índice de Danos (ID) e a Frequência de Danos (FD). Os dados estão apresentados na tabela 1, onde se pode verificar que o grupo que recebeu suco de couve cultivado em área de mineração (SCM) apresentou níveis de dano no DNA significativamente maior em relação aos grupos controle negativo (CN) e suco de couve orgânico (SCO) com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey), para ambos os parâmetros do ensaio cometa, em todos os tempos de exposição.

Quando comparados os horários de coletas de sangue (Figura 7), nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas ($p > 0,08$ ID; $p > 0,06$ FD).

Os tecidos fígado e córtex também foram avaliados através do Ensaio Cometa em ambos os parâmetros (Tabela 1). No fígado o grupo tratado com SCM apresentou nível de dano significativamente maior em relação ao grupo CN com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey) para a FD, e nível de dano significativamente maior em relação aos grupos CN e SCO com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey) para o ID, e o grupo SCO apresentou nível de dano significativamente maior em relação ao grupo CN com $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey) para ID.

No córtex o grupo tratado com SCM apresentou nível de dano significativamente maior em relação aos grupos CN e SCO com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey), em ambos os parâmetros.

Tabela 1: Detecção de danos em DNA de sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma aguda ao suco de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve-folha) cultivada em área de exploração de carvão, usando o Ensaio Cometa.

	Análise	Sangue periférico			Fígado	Córtex
		3h	6h	24h		
CN	ID	8,11 ± 4,68	7,43 ± 4,54	7,44 ± 4,48	36,00 ± 31,39	57,67 ± 58,21
	FD	5,56 ± 3,91	5,43 ± 2,30	4,54 ± 1,81	20,00 ± 13,00	24,92 ± 21,43
SCO	ID	9,40 ± 11,10	6,20 ± 6,22	11,80 ± 5,22	121,33 ± 39,53 ^c	64,40 ± 53,41
	FD	4,60 ± 4,39	6,00 ± 5,96	7,20 ± 4,44	45,33 ± 9,29	30,40 ± 25,93
SCM	ID	48,80 ± 18,94 ^{a,b}	39,40 ± 19,51 ^{a,b}	73,20 ± 26,98 ^{a,b}	240,43 ± 54,36 ^{a,b}	274,89 ± 77,57 ^{a,b}
	FD	32,00 ± 14,09 ^{a,b}	20,00 ± 4,30 ^{a,b}	39,40 ± 14,60 ^{a,b}	73,29 ± 18,89 ^a	84,89 ± 18,39 ^{a,b}

CN = Controle Negativo, SCO = Suco de Couve Orgânica, SCM = Suco de Couve da Mina, ID = Índice de Dano (0 = sem danos; 400 = dano máximo), FD = Frequência de Danos (%), valores avaliados em Média ± Desvio Padrão.

^a = Diferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey).

^b = Diferença significativa em relação ao grupo SCO com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey).

^c = Diferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey).

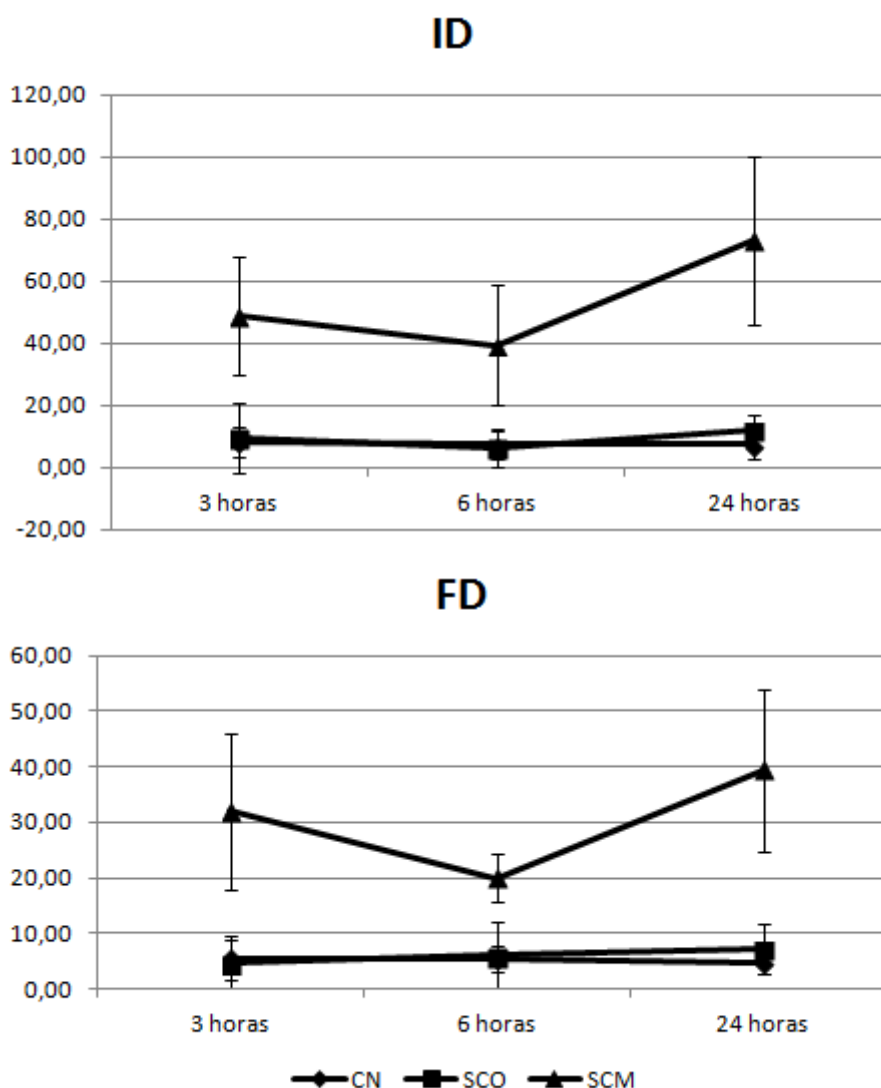


Figura 7 – Comparativo dos danos em DNA causados pelo suco de couve cultivada em área de rejeito da exploração de carvão em diferentes horas de exposição avaliadas de forma aguda através do Ensaio Cometa. (ID = Índice de Dano; FD = Frequência de Dano; CN = Controle Negativo; SCO = Suco de Couve Orgânica; SCM = Suco de Couve da Mina).

3.2 ENSAIO COMETA CRÔNICO

O Ensaio Cometa em sangue periférico no tratamento crônico foi realizado durante 30 dias de administração dos sucos, com coletas de sangue em 2, 5, 10, 20 e 30 dias de tratamento, sendo avaliados o Índice e a Frequência de Danos (ID e FD). Podemos observar que o grupo SCM apresentou nível de dano significativamente maior em relação aos grupos CN e SCO com $p < 0,01$ (ANOVA,

Tukey), em todos os dias de coleta e em ambos os parâmetros, com exceção ao ID da coleta de 30 dias que apresentou nível de dano significativamente maior em relação aos grupos CN e SCO só que com significância inferior, $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey) (Tabela 2).

Comparando os danos entre os dias de tratamento o grupo SCM apresentou diferença significativa entre os dias 10 e 30, e os dias 20 e 30 com $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey), apenas na FD.

Fígado e córtex também foram avaliados em ambos os parâmetros do EC nos 3 grupos tratados (Tabela 2), porém não apresentaram diferenças significativas entre eles (Fígado $p > 0,25$ ID e $p > 0,06$ FD; Córtex $p > 0,25$ ID e $p > 0,08$ FD).

Para verificar a possibilidade de reparo aos danos causados pela hortaliça cultivada em área de rejeito de carvão foram realizadas coletas de sangue no 30º dia de tratamento, 24 horas e 3 dias após o término do tratamento (Figura 8). Onde se observou que 24 horas após o término do tratamento os danos foram significativamente menores em relação ao grupo com coleta no 30º dia com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey) para a FD e $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey) para o ID, e 3 dias após o término houve redução significativa em relação ao grupo com coleta no 30º dia com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey) para ambos os parâmetros.

Tabela 2: Detecção de danos em DNA de sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma crônica ao suco de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve-folha) cultivada em área de exploração de carvão, usando o Ensaio Cometa.

	Análise	Sangue periférico					Fígado	Córtex
		2 dias	5 dias	10 dias	20 dias	30 dias		
CN	ID	8,33 ± 3,14	9,17 ± 10,46	2,50 ± 2,51	1,00 ± 1,67	10,80 ± 9,96	74,60 ± 37,84	45,60 ± 31,41
	FD	3,33 ± 3,14	2,83 ± 2,99	1,00 ± 0,89	0,50 ± 0,84	3,20 ± 2,68	22,60 ± 9,37	16,00 ± 10,68
SCO	ID	13,33 ± 14,83	7,83 ± 8,04	3,50 ± 4,72	1,00 ± 1,10	3,33 ± 3,06	93,50 ± 90,44	62,00 ± 19,35
	FD	7,17 ± 5,88	3,50 ± 2,59	1,17 ± 1,47	0,67 ± 0,82	3,33 ± 3,06	30,00 ± 26,08	29,40 ± 14,89
SCM	ID	73,00 ± 23,04 ^{a,b}	67,67 ± 46,45 ^{a,b}	28,20 ± 12,48 ^{a,b}	28,75 ± 16,64 ^{a,b}	67,11 ± 40,55 ^{c,d}	147,67 ± 78,65	78,33 ± 37,24
	FD	26,80 ± 7,60 ^{a,b}	25,33 ± 15,11 ^{a,b}	11,60 ± 5,32 ^{a,b}	10,25 ± 6,34 ^{a,b}	31,89 ± 13,59 ^{a,b}	51,00 ± 19,41	36,33 ± 14,95

CN = Controle Negativo, SCO = Suco de Couve Orgânica, SCM = Suco de Couve da Mina, ID = Índice de Dano (0 = sem danos; 400 = dano máximo), FD = Frequência de Danos (%), valores avaliados em Média ± Desvio Padrão.

^a = Diferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey).

^b = Diferença significativa em relação ao grupo SCO com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey).

^c = Diferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey).

^d = Diferença significativa em relação ao grupo SCO com $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey).

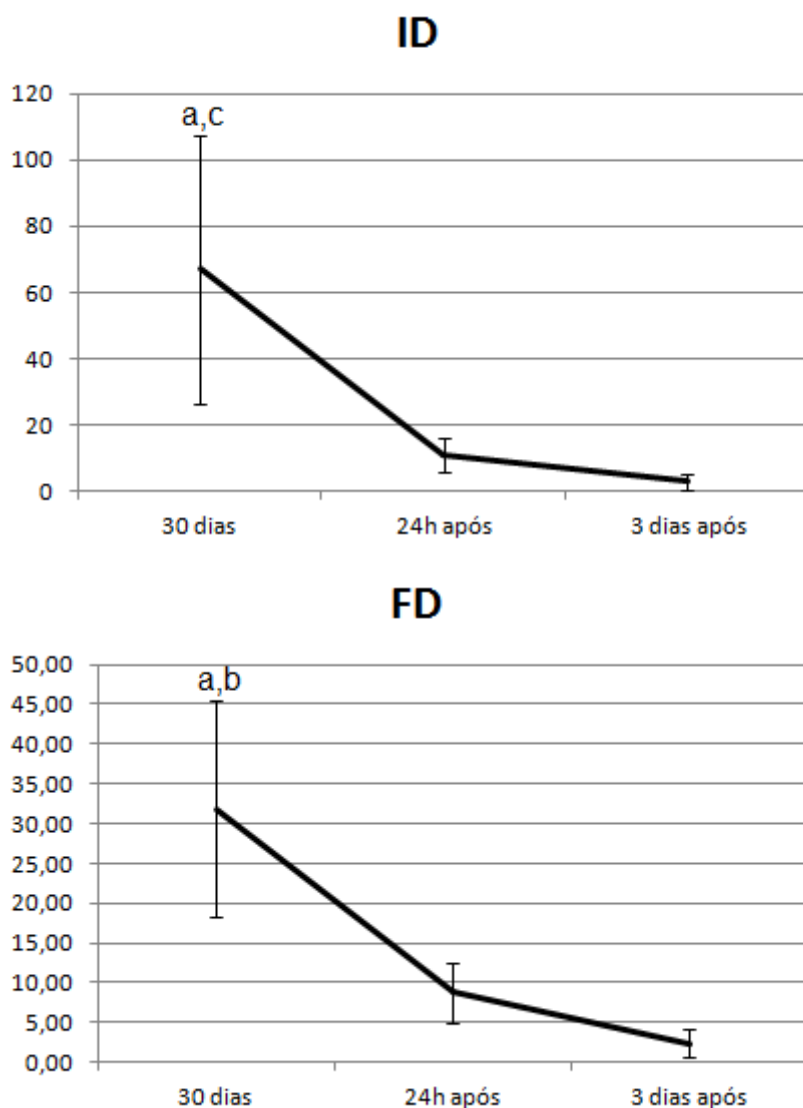


Figura 8 – Avaliação do reparo de células sanguíneas de camundongos expostos ao tratamento crônico com suco de couve cultivada em área de rejeito de carvão.

ID = Índice de Dano; FD = Frequência de Dano.

a = Diferença significativa em relação ao grupo 3 dias com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey).

b = Diferença significativa em relação ao grupo 24 horas com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey)

c = Diferença significativa em relação ao grupo 24 horas com $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey)

3.3 TESTE DE MICRONÚCLEOS

Para o Teste de Micronúcleos foi utilizado o esfregaço da medula óssea de camundongos expostos e não expostos ao tratamento com suco de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. cultivada em área de exploração de carvão. Foram avaliados dois parâmetros, toxicidade (relação EPC/ENC) e mutagenicidade (frequência de Micronúcleos).

Para a avaliação aguda os animais receberam uma dose única dos sucos e a coleta foi realizada 24 horas após. Na avaliação crônica os animais receberam os sucos durante 30 dias e a coleta realizada no 30° dia. Em ambos os tratamentos não foram encontradas diferenças estatísticas (agudo: $p > 0,50$ MNEPC e $p > 0,99$ EPC/ENC; crônico: $p > 0,39$ MNEPC, $p > 0,31$ MNENC e $p > 0,96$ EPC/ENC) (ANOVA), para as avaliações de toxicidade e mutagenicidade (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação da mutagenicidade em camundongos expostos e não expostos ao tratamento de forma aguda e crônica ao suco de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (Couve-folha) cultivada em área de exploração de carvão, usando o Teste de Micronúcleos em medula óssea

	Agudo		Crônico		
	MNEPC	EPC/ENC	MNEPC	MNENC	EPC/ENC
CN	0,13 ± 0,35	0,65 ± 0,10	0,33 ± 0,82	0,00 ± 0,00	0,57 ± 0,04
SCO	0,00 ± 0,00	0,84 ± 0,06	0,33 ± 0,52	0,33 ± 0,52	0,62 ± 0,11
SCM	0,33 ± 0,50	0,75 ± 0,11	0,83 ± 0,75	0,33 ± 0,52	0,53 ± 0,06

CN = Controle Negativo, SCO = Suco de Couve Orgânico, SCM = Suco de Couve da Mina, EPC = Eritrócitos Policromáticos, ENC = Eritrócitos Normocromáticos, MNEPC = Eritrócitos Policromáticos Micronucleados, MNENC = Eritrócitos Normocromáticos Micronucleados; Valores avaliados em Média ± Desvio Padrão.

4 DISCUSSÃO

A mineração de carvão é umas das atividades de exploração com maior potencial poluidor, contendo 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). Os efeitos induzidos pelos metais são variados, desde efeitos tóxicos sistêmicos, irritantes, agudos ou crônicos a efeitos teratogênicos, mutagênicos e cancerígenos (TAVARES; CARVALHO, 1992). Muitos desses metais pesados presentes nos rejeitos do carvão, são enriquecidos com substâncias genotóxicas e com alto risco tóxico, podendo provocar alterações nas células, tecidos, populações e ecossistemas (AGOSTINI; OTTO; WAJNTAL, 1996; SÁNCHEZ-CHARDI et al., 2008). Igualmente aos animais, as plantas também podem ser danificadas quando expostas ao excesso de metais pesados em seu ambiente de crescimento (CARDOSO; NAVARRO; NOGUEIRA, 2003). Freitas; Zocche; Quadros (2007) comprovaram o comportamento das plantas em concentrar elementos de forma diferenciada em diferentes estruturas.

Em nossos resultados pudemos observar que o suco de couve cultivada sobre depósitos controlados de rejeitos da exploração de carvão, mesmo com todo o preparo da terra, é genotóxico tanto de forma aguda quanto crônica. Mostramos que os animais que foram tratados com hortaliças da mina obtiveram danos genéticos significativamente maiores comparados com os animais tratados com hortaliças cultivadas de modo orgânico e o controle negativo (água).

Segundo Clemens (2006) a absorção e o acúmulo de metais tóxicos em espécies vegetais representam a principal via de entrada potencialmente ameaçadora à saúde humana e animal a partir da alimentação. Ressalta ainda, que as plantas possuem uma tolerância a níveis elevados de metais o que pode ser mais prejudicial para os consumidores.

Gonçalves (2012a) demonstrou através do Ensaio Cometa de sangue periférico, fígado e córtex de camundongos a genotoxicidade do suco de alface cultivada sobre áreas de rejeitos da exploração de carvão expondo-os de forma aguda ao suco dessa hortaliça, mas não obteve diferenças significativas no teste de micronúcleos de medula óssea, mostrando semelhanças com nossos resultados obtidos. Comparado com nossos resultados o estudo de Villatoro-Pulido et al.,

(2009) também detectou genotoxicidade em uma planta utilizada como fonte alimentícia, sendo que esta foi vinculada a exposição de metais pesados (As, Pb e Cd), provindos do solo de uma área próxima a uma mineradora, apresentado contaminação tanto das raízes quanto das partes comestíveis, constituindo-se um risco para toda a cadeia alimentar, devido aos efeitos nocivos desses metais. Ejaz et al. (2012) determinaram a carga tóxica do aumento de metais, utilizando a técnica de PIXE (Indução de Raio-X por Partículas) e análises histopatológicas, e destacaram seus potenciais riscos.

No entanto, os danos mostrados através do Ensaio Cometa são passíveis de reparo. Como se pode observar em nossos resultados após o término do tratamento crônico o grupo avaliado como reparo, obteve uma redução significativa nos danos em apenas 24 horas, e em três dias voltou quase a um nível basal de danos. Já foi repetitivamente demonstrado que íons metálicos podem inibir a reparação de danos no DNA, mas a reparação do DNA é um processo importante para evitar a mutagênese (GALARIS; EVANGELOU, 2002). Segundo Guo; Yang; Wu, (2008) o sistema de reparo existente no DNA consegue reverter danos oxidativos. Entretanto o potencial aumento de incidências de erros durante a auto-reparação do DNA não pode ser ignorado, pois podem ser responsáveis por mutações e tumores no corpo do indivíduo.

Leffa et al. (2010) expuseram moluscos a alface cultivada na mina e obtiveram diferenças significativas, semelhantes aos nossos resultados, onde o sistema de reparo pode ser observado ao longo dos tempos de exposição. Eles observaram que após 48 horas de exposição atingiu-se um platô nos danos genotóxicos e houve a diminuição dos mesmos nos dias subsequentes, mas sempre mantendo níveis elevados em relação ao controle.

A diferença nos nossos resultados entre os dois testes provavelmente deve-se aos diferentes ensaios genotóxicos utilizados. O Ensaio Cometa detecta lesões no DNA que ainda podem ser reparadas, enquanto que o Teste de Micronúcleos detecta danos que não podem mais ser reparados. De fato, o ensaio cometa e o teste do micronúcleo possuem naturezas distintas, cada um com suas vantagens e restrições e, por isso, têm sido aplicados em conjunto para a avaliação de danos genéticos. Enquanto o ensaio cometa detecta lesões reversíveis, o teste do micronúcleo detecta lesões mais persistentes no DNA ou efeitos aneugênicos que não podem ser reparados. Os danos mensurados pelo ensaio do cometa

aparecem mais cedo do que o Micronúcleo, que requer uma divisão celular para ser visualizado (SOUZA, 2005). A maior parte do dano ao DNA é reparada pelo eficiente mecanismo celular de reparo, enquanto que uma pequena parte do dano resulta em mutação (BENASSI, 2004). Nossos resultados mostraram que os danos no DNA foram reparados após o término dos tratamentos, portanto não obtivemos diferenças significativas no Teste de Micronúcleos.

Compostos metálicos podem alterar o crescimento celular através de vários mecanismos distintos. As alterações na regulação dos genes são observadas antes de uma possível manifestação de tumores, estas podem não ser fixadas por mutações, sendo necessário um tempo muito prolongado de exposição para provocar modificações genéticas persistentes. Os íons metálicos podem desregular a proliferação celular através da inativação dos processos apoptóticos, o que resultaria em uma adaptação à citotoxicidade dos metais (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008). Galaris, Evangelou (2002) dizem que talvez os metais atuem em conjunto com outros fatores genotóxicos, como estresse oxidativo e radicais livres, e que para compreender melhor esses processos deve-se entender o envolvimento dos metais na manutenção da homeostase celular. Henkler, Brinkmann e Luch (2010) afirmaram que os efeitos adversos dos radicais livres são equilibrados pelas adaptações das respostas antioxidantes celulares, o que pode explicar as dificuldades experimentais para tratar especificamente o significado das espécies reativas de oxigênio na mutagênese desencadeado por metais pesados ou xenobióticos.

Segundo Kalloo (2008) a *Brassica oleracea* L. var. *acephala* é uma rica fonte em vitamina C., Korus (2011) verificou que 100 g de folhas cruas de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. contem 683 mg de vitamina C, e Korus, Lisiewska (2011) confirmaram suas propriedades antioxidantes assemelhando com Trolox (Antioxidante comercial com propriedades conhecidas).

Tais propriedades podem justificar a eficiência do sistema de reparo nos animais avaliados neste experimento, já que o estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio, criado pela excessiva geração de oxidantes ou uma diminuição de antioxidantes (GUO; YANG; WU, 2008).

Gonçalves et al. (2012b) avaliaram o potencial genotóxico e/ou antigenotóxico do extrato hidroalcoólico da *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. em diferentes células de camundongos, e os resultados obtidos neste estudo

mostraram que nenhuma das concentrações utilizadas mostrou efeito genotóxico pelo ensaio cometa, ou mutagênico pelo teste de micronúcleo. E, além disso, a couve teve efeito antígenotóxico, sendo capaz de promover uma inibição de dano em DNA induzido pela doxorubicina, efeito este que poderia ser justificado pela presença de antioxidantes no extrato administrado. Fagundes (2012) demonstrou através do ensaio cometa de células sanguíneas de camundongos, a ação protetora e de reparo da hortaliza *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. aos danos ao DNA em um pré e um pós-tratamento com MMS (Metil Metanosulfonato) e CP (Ciclofosfamida). Uma possibilidade existente é que a couve tenha exercido um efeito protetivo ao DNA dos camundongos utilizados no nosso experimento. Sugere-se que os metais geram quantidades significativas de oxidantes, e que este aumento possa ter sido atenuado pela provável ingestão simultânea de grandes quantidades de vitamina C presentes na couve, levando a genotoxicidade e detecção dos danos através do ensaio cometa de sangue agudo e crônico, mas não levando a formação de danos no córtex e no fígado no tratamento crônico, e não levando a mutagenicidade, portanto não sendo visualizados danos no teste de micronúcleos.

Mesmo tendo essas propriedades a couve não protegeu totalmente os camundongos dos danos causados pelos metais absorvidos por ela, sendo então que o consumo de couve cultivada em áreas de depósitos de rejeito da exploração de carvão ou próximas a essas áreas, onde há risco de contaminação por metais, deverá ser evitado ou feito com extrema cautela, para evitar os riscos aos quais essa forma de cultivo expõem quem as consome.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o consumo de *Brassica oleracea* L. Var. *acephala* D.C. cultivada em área de exploração de carvão deverá ser realizado com extrema cautela, sendo que estas apresentaram alto potencial genotóxico, principalmente em células sanguíneas, mesmo que esta hortaliça ofereça uma ação protetora e reparadora de danos ao DNA. Por isso mais estudos são necessários para confirmação destes resultados.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, N. Z. Diagnóstico ambiental da região carbonífera de Santa Catarina: degradação dos recursos naturais. **Revista Tecnologia e Ambiente**, v. 5, n. 2, p. 35-53, 1999.
- AGOSTINI, J. M. S.; OTTO, P. A.; 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. **Revista Brasileira de Genética**, v. 19, n. 4, p. 641-646, 1996.
- BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 21-34, 2005.
- BEYERSMAMM, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of toxicology**, v. 82, p. 493-512, 2008.
- BRASIL. Ministério. CONAMA. **Resolução CONAMA n. 001 de 23 de janeiro de 1986. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília**. 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, 1983. 322p.
- BROWN, R. E. Significance of trace metals and nitrates in sludge soils. **Journal WPCF**, v. 47, n. 12, p. 2863-2875, 1975.
- 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 Ciências do Solo**, v. 27, p. 415-423, 2003.
- 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.
- CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, v. 88, p. 1707-1719, 2006.
- COLLINS, A. R., Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. **BioEssays**, v. 21, p. 238-246, 1999.
- CONSTANTINO, L. C. **Avaliação do dano oxidativo em tecido hepático de camundongos tratados com *Baccharis trimera* (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.; ZOCHE, J. J.; ZOCHE-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**, v. 5, p. 765-767, 2007.

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.** 2010. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

DA SILVEIRA, F.Z.; DE FAVERI, T.M.; RICKEN, C.; ZOCHE, J.J.; PICH, C.T. Toxicity and genotoxicity evaluation of acid mine drainage treatment using *Artemia sp.* and *Geophagus brasiliensis* 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.

DE FAVERI, T.M.; SILVEIRA, F.Z.; RICKEN, C.; ZOCHE, 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.

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

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

EJAZ, S.; ASHRAF, M.; SHAKIR, L.; AHMAD, N. Exploratory study using proton induced X-ray emission analysis and histopathological techniques to determine the toxic burden of environmental pollutants. **Environmental Pollution**, v. 170, p. 242-253, 2012.

FAGUNDES, G. E. **Influência de sucos de hortaliças fonte de luteína e beta-caroteno sobre a genotoxicidade induzida por agentes alquilantes em camundongos.** 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

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

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

FREITAS, M.; ZOCHE, J. J.; QUADROS, K. E. Metais pesados (Mn e Zn) em *Typha domingensis* Pers. em áreas de mineração de carvão. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 789-791, 2007.

GALARIS, D.; EVANGELOU, A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, p. 93-103, 2002.

GRASSI, J. P. **Genotoxicidade em tecido hepático e sanguíneo de camundongos tratados com *Baccharis trimera* (Less.) Dc. de ocorrência em solo degradado pela mineração de carvão a céu aberto, Treviso, Santa Catarina**. 2007. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

GONÇALVES, A. L. M.; LEMOS, M.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F.; MAISTRO, E. L. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 740-745, 2012b.

GONÇALVES, C. D. P. **Avaliação dos danos genotóxicos ao DNA de camundongos expostos a hortaliças cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos de carvão**. 2012a. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

GUO, L.; YANG, J. Y.; WU, C. F. Oxidative DNA damage induced by ethanol in mouse peripheral leucocytes. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 103, p. 222-227, 2008.

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**, v. 29, p. 115-127, 1995.

HENKLER, F.; BRINKMANN, J.; LUCH, A. The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. **Cancers**, v. 2, p. 376-396, 2010.

HORBACH, R.; KUCK, L.; MARIMON, R. G.; MOREIRA, M. L. D.; MARIMON, M. P. C.; PIRES, J.L.; VIVIAN, D.; MARINHO, D.; TEIXEIRA, W. Geologia. In: **Levantamento de recursos naturais**. Ed. 33. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 1986. p. 29-312.

KALLOO, G. Kale: *Brassica oleracea* L. var. *acephala*. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 642-648, 2008.

KORUS, A. Effect of preliminary processing, method of drying and storage temperature on the level of antioxidants in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1711-1716, 2011.

KORUS, A. LISIEWSKA, Z. Effect of preliminary processing and method of preservation on the content of selected antioxidative compounds in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves. **Food Chemistry**, v. 129, p. 149-154, 2011.

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**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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**, 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**, v. 18, p. 87-94, 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 open coal mining area. **Mutation Research**, v. 630, p. 42-49, 2007.

MAMIRAUÁ – INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. **Bioestat 5.0**. Tefé, AM., 1999. Disponível em: <<http://mamiraua.org.br/downloads/programas>>. Acessado em: 07/03/2013.

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

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. **Mutation Research**, v. 239, p. 29-80, 1990.

PARÁIBA, 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**, v. 16, p. 125-134, 2006.

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

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>. Acesso em: 03 jul. 2012.

ROWLING, J. K. **Harry Potter: e a Câmara Secreta**. Tradução de WYLER, L. Rio de Janeiro: Rocco, 2000. 287 p.

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

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*. **Environmental Pollution**, 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, 2004. p. 663-671.

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**, v. 175, p. 184-191, 1988.

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**, v. 13, p. 302-315, 2001.

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**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos no recôncavo baiano. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

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.

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, 1995. p. 69-79.

VILLATORO-PULIDO, M.; FONT, R.; HARO-BRAVO, M. I.; ROMERO-JIMÉNEZ, M.; ANTER, J.; BAILÓN, A. H.; ALONSO-MORAGA, A.; RÍO-CELESTINO, M. Modulation of genotoxicity and cytotoxicity by radish grown in metal-contaminated soils. **Mutagenesis**, v. 24, n. 1, p. 51-57, 2009.

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**, v. 21, p. 76-80, 2002.

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

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

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. 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 MASTOZOLOGIA, 4, 2008, São Lourenço - MG. **Anais...** São Lourenço: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008. p. 1-10.

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

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

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 fitossociologia: Fundamentos para a avaliação e manejo de ecossistemas**. 1. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2008. p. 195-220.