

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

Maiélen Machado de Jesus

**AVALIAÇÃO DOS DANOS DE DNA CAUSADOS PELA INGESTÃO DE SUCO DE
Lactuca sativa L. CULTIVADA EM HORTA CONSTRUÍDA SOBRE DEPÓSITOS
DE REJEITOS DE CARVÃO**

Criciúma SC

2014

Maiélen Machado de Jesus

**AVALIAÇÃO DOS DANOS DE DNA CAUSADOS PELA INGESTÃO DE SUCO DE
Lactuca sativa L. CULTIVADA EM HORTA CONSTRUÍDA SOBRE DEPÓSITOS
DE REJEITOS DE CARVÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Bacharelado no curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vanessa Moraes de Andrade

Criciúma

2014

Maiélen Machado de Jesus

**AVALIAÇÃO DOS DANOS DE DNA CAUSADOS PELA INGESTÃO DE SUCO DE
Lactuca sativa L. CULTIVADA EM HORTA CONSTRUÍDA SOBRE DEPÓSITOS
DE REJEITOS DE CARVÃO**

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

Criciúma, 23 de Junho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Vanessa Moraes de Andrade - Doutora - (UNESC)

Prof^ª - Paula Rohr – Doutora - (UNESC)

Prof. Jairo José Zocche - Doutor - (UNESC)

Com muito amor e carinho dedico este trabalho aos meus pais Maricléia e José, e também ao meu irmão Uriel. Vocês são minha fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** que é a minha força nas horas de dificuldade, e quem guia meus passos na jornada da vida.

Aos meus pais **Maricléia** e **José** que são o meu alicerce e espelho, por sua total dedicação, em não medir esforços financeiramente para ver o meu sucesso, jamais me deixarem desistir e sempre estarem comigo.

Ao meu irmão **Uriel**, simplesmente não há como te agradecer por tudo que você representa pra mim, parceiro nos momentos bons e difíceis, não importando à situação me estendendo a mão.

A pessoa que me proporcionou a realização deste sonho, obrigada por tudo que fizeste por mim tia **Janice**.

A minha orientadora **Vanessa**, pela oportunidade de ampliar meus horizontes no conhecimento e por sua dedicação em todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos **Karina** e **Victor Hugo** por todos os dias que passamos realizando este trabalho, principalmente nos feriados e pela amizade. Tudo seria muito mais difícil sem vocês.

A todo o grupo do LABIM, **Francine**, **Luiza**, **Ana Luiza**, **Maiara** e em especial a **Daniela**, **Adriane** e **Paula** que muito me ajudaram durante o período em que fui aluna de iniciação científica.

Aos amigos de sala mais que especiais, **Gabriela** minha formiga preferida que sempre me acolheu em sua casa quando precisei ficar na cidade, **Ana Paula** minha prima emprestada com quem sempre pude compartilhar os desabafos da vida, **Lucilene** e **Gustavo** simplesmente por sua amizade sentirei falta de nossas impicâncias diárias.

Aos amigos “família” **Jaine**, **Louise**, **Natália**, **Bruno**, **Ricardo** e **Leonardo** que compreendem minha ausência nos últimos dias, parceria eterna.

E a todos que de alguma forma participaram de minha vida e deixaram sua marca.

“O fim de toda nossa busca será chegarmos onde começamos e ver o lugar pela primeira vez”.

T.S.Eliot

RESUMO

A mineração de carvão é uma das atividades econômicas mais importantes do país, e a fonte de energia mais utilizada em todo o mundo, porém com potencial poluidor altíssimo ao meio ambiente. Por esse fato o objetivo deste trabalho foi avaliar os danos causados pelo consumo de *Lactuca sativa* L. cultivada em horta experimental construída sobre depósitos de rejeitos de carvão, ao DNA de camundongos Swiss. Para isso foram utilizados 18 animais divididos em 3 grupos: solução salina (CN), suco de alface cultivada de modo orgânico (SAO), suco de alface cultivada sobre depósito controlado de rejeito de carvão (SAM). A solução salina (NaCl 0,9%) e o suco das folhas de alface foram administrados por gavagem por 30 dias, com coletas de sangue em 2, 5, 10, 20 e 30 dias para o ensaio cometa e no trigésimo dia os animais foram mortos por deslocamento cervical para retirada do fígado e córtex cerebral para o ensaio cometa que avalia a genotoxicidade, e medula óssea para o teste de micronúcleos que avalia o potencial mutagênico. Em ambos os parâmetros do ensaio cometa o tratamento do grupo SAM foi genotóxico em relação ao grupo CN e ao grupo SAO em todos os dias de exposição. No teste de micronúcleos não houve diferença significativa em nenhum dos grupos avaliados. Concluímos então que o consumo de hortaliças cultivadas em área de mineração de carvão gera um sério risco a saúde humana e animal.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L. Ensaio Cometa. Teste de Micronúcleos. Genotoxicidade. Rejeito de carvão mineral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1 – Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese por metais.....	13
Figura 2 - Localização da Unidade Minerária II da Carbonífera Criciúma S.A., A: localização da horta experimental.....	16
Figura 3 - Foto dos canteiros da horta experimental construída sobre depósitos de rejeitos de carvão.....	17
Figura 4 – Classes de dano obtidas pelo Ensaio Cometa.....	19
Figura 5 - Esquema geral da formação de MN.....	20
Tabela 1: Detecção de danos em DNA de sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma crônica ao suco de <i>Lactuca sativa</i> L. cultivada (alface lisa) em área de exploração de carvão, usando o Ensaio Cometa.....	22
Tabela 2: Avaliação da mutagenicidade em camundongos expostos e não expostos ao tratamento aos sucos de hortaliças cultivadas em área de exploração de carvão, usando o Teste de Micronúcleos em medula óssea.	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA.....	16
3.2 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA EM ESTUDO.....	16
3.3 HORTALIÇA E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	17
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	18
3.5 ENSAIO COMETA	18
3.6 TESTE DE MICRONÚCLEO (MN)	19
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	20
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Entre todas as formas de energia não renováveis o carvão mineral é quem ocupa o primeiro lugar em quantidade disponível e é considerada no mundo a principal fonte de energia a longo prazo (BORBA, 2001). Embora a extração do carvão cause vários impactos ambientais, ele é utilizado ao redor do mundo como fonte de energia elétrica por suas características abundância e distribuição geográfica das reservas; baixos custos e estabilidade nos preços em relação a outros combustíveis (ANEEL, 2008).

No estado de Santa Catarina a exploração do carvão é realizada de duas maneiras, a céu aberto e em minas subterrâneas. O que define e qual o método de lavra utilizado é a profundidade da jazida. Quando a jazida está localizada próxima ao nível do solo ou a uma profundidade de até 30m, é utilizada a lavra a céu aberto. E quando a jazida está localizada entre 30m e 120m de profundidade é utilizada a lavra subterrânea (KLEIN, 2006). Os processos são diferentes, porém ambos geram problemas ambientais como: mudança na estrutura do ambiente, através da inadequada deposição dos resíduos da mineração, como rejeitos e estéreis (CAMPOS; ALMEIDA; SOUZA, 3003).

A Bacia Carbonífera Catarinense localiza-se no sudeste do estado, entre os paralelos 28°48'25" e 28°23'54" e meridianos 49°33'38" e 49°15'11", abrangendo uma área de 1850 km² e ocupando uma faixa de 95 km de comprimento por 20 km de largura (HORBACH et al., 1986). A lavra mecanizada do carvão, nesta região, teve início por volta de 1940 (CETEM, 2001) e desde então, tem provocado alterações físicas, químicas e biológicas nos ecossistemas, comprometendo de forma direta os recursos hídricos, o solo e à biota (FREITAS et al., 2007; ZOCHE et al., 2010b).

Comparando a mineração do carvão com outras formas de degradação, assim como a agricultura e a pecuária, é possível observar que ela atinge extensões reduzidas. Contudo através dos elementos solubilizados dos rejeitos de carvão, que podem atingir os cursos d'água causando impactos ambientais negativos até mesmo em áreas distantes do local onde está ocorrendo a mineração (SALOMONS, 1995). 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), que possuem atividades mutagênicas

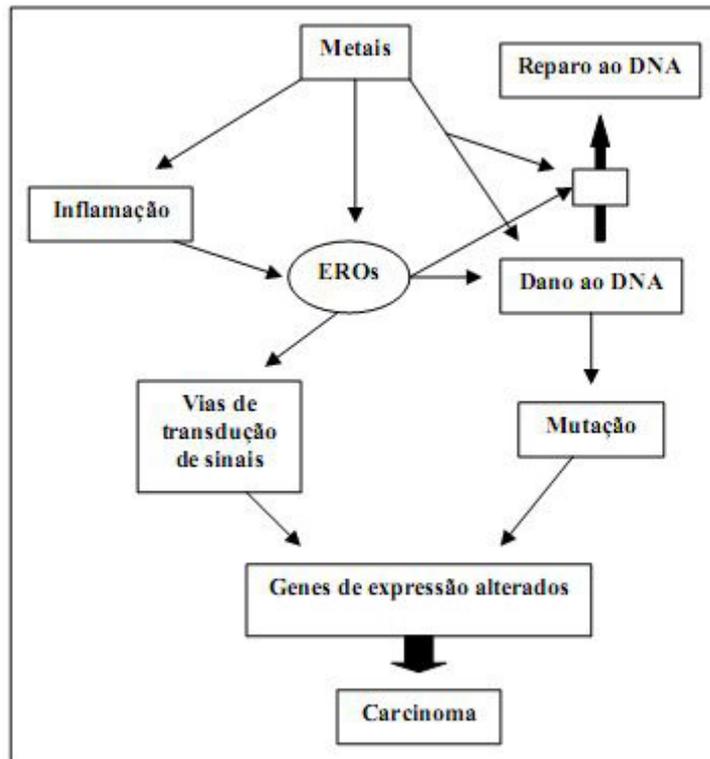
e carcinogênicas (PERALBA, 1990). Metais pesados e outros elementos, quando acumulados por organismos possuem um efeito abrangente, visto que esses contaminantes são transferidos através dos vários níveis tróficos da cadeia alimentar, sendo assim os predadores são os que expressam concentrações mais elevadas (BROWM,1975).

O acúmulo de metais pesados nos solos e plantas é preocupante devido ao potencial risco a saúde humana. A contaminação pela cadeia alimentar é uma importante via de entrada para poluentes tóxicos no corpo humano. O acúmulo de metais pesados nas plantas depende da espécie vegetal, e da eficiência de diferentes plantas na absorção de metais, que é avaliada através da captação ou dos fatores de transferência de metais pesados entre solo-plantas. Desse modo hortaliças cultivadas sobre solos com metais pesados possuem um potencial risco a saúde de seus consumidores (KHAN et AL., 2008). De forma geral os metais são classificados como essenciais e não essenciais, o manganês, o ferro, o zinco, o selênio e o cobre, denominados microminerais essenciais encontram-se presentes fisiologicamente nos organismos vivos, com elevada incidência e são encontrados naturalmente em alimentos, frutas e multivitamínicos. Já o cádmio e o chumbo, classificados como não essenciais, são potencialmente tóxicos e indutores de efeitos biológicos adversos mesmo em concentrações reduzidas (LOPES, 2009).

Os metais pesados considerados essenciais, quando presentes em concentrações elevadas também podem provocar alterações físicas, químicas e biológicas no solo (LIMA, 2008). E apresentam alta toxicidade aos organismos vegetais e animais, causando efeitos danosos aos mesmos (DAMIANI, 2010; POZZA, 2001).

Quando absorvidos, os metais pesados tornam-se agentes genotóxicos que interagem quimicamente com o material genético, formando adutos (agentes pré-mutagênicos), alterações oxidativas ou mesmo quebras na molécula de DNA. Normalmente a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. No caso de essa lesão ser fixada, causando alterações hereditárias (mutações), podendo ser perpetuadas nas células filhas no processo de replicação, o agente é então denominado mutagênico (SOUZA, 2005; MEJÍA, 2011).

Figura 1 – Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese por metais.



Fonte: Adaptada de Galaris e Evangelou (2002).

O esquema acima demonstra de que maneira os metais pesados causam dano ao DNA, que pode ser de forma direta ou indireta, através da formação das espécies reativas de oxigênio (EROs). A formação dessas EROs são atingidas pelos metais por diversas vias. Um dos exemplos é pela reação de Fenton, que induz a um processo inflamatório ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{HO}^-$), ou pela formação intermediária de tiorradicais ($\text{RSH} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{RS}\cdot + \text{Cu}^{++} + \text{H}^+$). Muitos dos danos causados ao DNA são revertidos através do eficaz mecanismo de reparo celular, resultando em mutações apenas uma porção reduzida. Outro fator que influencia o equilíbrio redox intracelular são as alterações nos níveis das EROs, que afetam diretamente as vias de transdução de sinais, que tem a função de ativar ou inativar diversos fatores de transcrição. A expressão de vários genes para a transformação

celular podem ser moduladas pelos fatores de transcrição e pela mutação, levando ao desenvolvimento do câncer (BENASSI, 2004).

Através dos ensaios de genotoxicidade em estudos ambientais podemos obter a detecção de danos genotóxicos em qualquer nível trófico, sendo interpretada como alerta devido às conseqüências populacionais e ecológicas que podem ocorrer quando um organismo está exposto a agentes tóxicos prejudiciais a saúde (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Para avaliar os danos causados ao DNA foram criados testes que avaliam de formas diferentes o resultado desses agentes com o DNA, entre eles destacam-se o Teste de Micronúcleos e o Ensaio Cometa. No Ensaio Cometa, que analisa o índice e a frequência de danos ao DNA, o dano é verificado quando fragmentos do DNA migram do núcleo da célula, Esta técnica é sensível e rápida na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA (FAIRBAIRN et AL., 1995; SINGH et AL., 1988). Em contra partida o Teste de Micronúcleos avalia danos que já não são passíveis de reparo, ou seja, mutações no DNA (MAVOURNIN et AL., 1990).

Assim sendo, este trabalho baseia-se na hipótese de que consumir hortaliças cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos de carvão pode representar riscos a saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os danos causados por *Lactuca sativa* L. cultivada em horta experimental construída sobre depósitos de rejeitos de carvão, ao DNA de camundongos Swiss.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a mutagenicidade no DNA de camundongos Swiss, devido ao consumo de *L. sativa* cultivada em horta experimental construída sobre depósitos de rejeitos de carvão, através do Teste de Micronúcleos;

Avaliar a genotoxicidade no DNA de camundongos Swiss, devido ao consumo de *L. sativa* cultivada em horta experimental construída sobre depósitos de rejeitos de carvão, através do Ensaio Cometa.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, adultos, provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram mantidos a temperatura ambiente controlada (23 ± 1 °C) com ciclo claro-escuro de 12 horas, água e comida foram oferecidas *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais segundo nº protocolo 110/2011.

3.2 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA EM ESTUDO

A área de estudo foi a Carbonífera Criciúma S/A, coordenadas $28^{\circ}47'19''\text{S}$ e $49^{\circ}26'32''$, no município de Forquilha, Santa Catarina, Brasil (Fig.1), e ocupa uma área de 135 ha. A horta foi construída sobre um antigo depósito controlado de rejeito do beneficiamento de carvão. Segundo informação pessoal do Engº. Schneider, nesse depósito a última camada de rejeitos depositados foi recoberta por uma camada de aproximadamente 50 cm de argila, sobre essa camada de argila foi espalhado uma camada de 30 cm de solo vegetal, obtido de uma zona superficial do perfil natural do solo de uma área de empréstimo e sobre essa camada foram construídos os canteiros da horta.

Figura 2 - Localização da Unidade Minerária II da Carbonífera Criciúma S.A., A: localização da horta experimental.



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 à alimentação dos funcionários.

Figura 3 - Foto dos canteiros da horta experimental construída sobre depósitos de rejeitos de carvão.



Fonte: Autor

3.3 HORTALIÇA E PREPARO DAS AMOSTRAS

A hortaliça utilizada foi *Lactuca sativa* L. (alface lisa), cultivada no município de Içara, SC de modo orgânico certificado (controle) fornecida pelo senhor Pedro Alcino Budny, e cultivada sobre depósito controlado da exploração do carvão (experimental). Os animais foram expostos por meio de gavagem ao suco da hortaliça processada em um processador de frutas, o tratamento foi administrado para grupos compostos de seis indivíduos em uma dose de 0,1 mL/10 g de peso corporal por 30 dias.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado através da administração de solução salina (NaCl 0,9%) ou suco das folhas de alface por 30 dias, com coletas de sangue em 2, 5, 10, 20 e 30 dias.

Foram utilizados 18 animais divididos em 3 grupos com 6 animais cada grupo, conforme descrito a seguir:

CN - controle negativo solução salina (NaCl 0,9g);

SAO - suco de alface cultivada de modo orgânico;

SAM - suco de alface cultivada sobre depósito controlado de rejeito de carvão;

As coletas de sangue foram realizadas logo após as administrações durante o tratamento, por incisão da veia caudal e após 24 horas da última administração. Ao final do 30º dia de tratamento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e coletado o fígado e o córtex para o ensaio cometa e a medula óssea para o teste de micronúcleo.

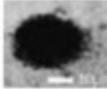
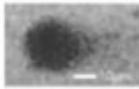
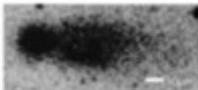
3.5 ENSAIO COMETA

O emprego do Ensaio Cometa seguiu os protocolos internacionais já estabelecidos para a sua realização (TICE et al, 2000). O preparo das lâminas foi realizado a partir da mistura de 5µL de sangue ou 10 µL de tecido homogeneizado com 90µL de agarose Low Melting Point (0,75%). Coloca-se então, tal mistura (células/agarose) em lâmina de microscópio pré-revestida com 300µL de 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 (2,5M 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% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após este período, as lâminas são incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para que ocorra o desenovelamento do DNA. Realiza-se a corrida eletroforética a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas as etapas ocorrem sob luz amarela indireta. Posteriormente as lâminas são neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA é corado com

nitrate de prata (VILLELA, et al, 2006). (20µg/mL) para análise em microscópio óptico com aumento de 400x.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células são avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo 0 a classificação para ausência de cauda, até 4 para o comprimento máximo de cauda. desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero (100 X 0 = 0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100 X 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. São utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento (COLLINS et al 1997).

Figura 4 – Classes de dano obtidas pelo Ensaio Cometa.

<i>Danos observados no DNA</i>	<i>Cabeça (núcleo original) / cauda (fragmentos do DNA)</i>	<i>Classe dos Danos</i>
	Sem cauda	0
	≤ 1	1
	1-2	2
	≥ 2	3
	Sem cabeça	4

Fonte: VILLELA et al., 2006

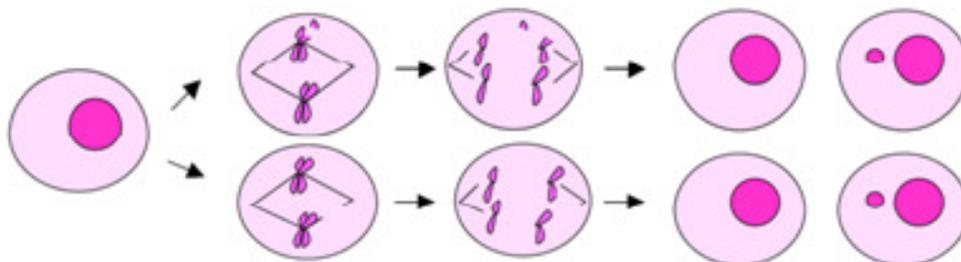
3.6 TESTE DE MICRONÚCLEO (MN)

O teste de MN em camundongos foi realizado conforme protocolos padrões internacionais (MAVOURNIN et al., 1990). Os animais foram mortos por deslocamento cervical, seguindo-se a retirada da medula óssea utilizando-se uma

agulha histológica como auxílio. Com este material, foram feitas duas lâminas por animal. Para tanto, a medula óssea foi macerada com soro bovino fetal sobre uma lâmina de vidro, fazendo-se um esfregaço direto. Após secagem das lâminas, estas foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato pH 5.8, por cinco minutos, sendo logo após codificadas para análise às cegas. 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 normocromáticos (EPC/ENC) em 100 células.

A origem do micronúcleo ocorre na divisão mitótica, na quebra cromossômica ou no atraso cromossômico durante a anáfase (SOUZA, 2005; MEJIÁ, 2011). Deste modo todo fragmento ou cromossomo(s) inteiro (s) desarraigado do núcleo principal, formam um pequeno núcleo, chamado de micronúcleo (SILVA, 2008).

Figura 5 - Esquema geral da formação de MN.



Fonte: LEON et al, 2007

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis são apresentadas em média \pm D.P. de seis 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. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

Os resultados da avaliação genotóxica da hortaliça *Lactuca sativa* L. cultivada sobre depósito de rejeito de carvão através do Ensaio Cometa em sangue periférico e demais órgãos de animais tratados cronicamente estão apresentados na Tabela 1.

O ensaio cometa em sangue periférico foi realizado durante 30 dias de administração do suco da hortaliça *Lactuca sativa* L., com coletas de sangue em 2, 5, 10, 20 e 30 dias de tratamento, onde foi avaliado o Índice de danos (ID) e a Frequência de danos (FD). Observamos que o SAM apresentou níveis de danos estatisticamente significativos com relação aos grupos CN e SAO nas coletas de 2 e 10 dias em ambos os parâmetros com $p < 0,001$ (ANOVA, Tukey). Na coleta de 5 dias, o SAM apresentou danos significativos com relação ao grupo CN com $p < 0,01$ tanto em ID quanto em FD e em relação ao SAO com $p < 0,05$ para FD e $p < 0,01$ para ID (ANOVA, Tukey). Na coleta 20 dias, o grupo SAM apresentou danos significativos com relação aos grupos CN e SAO com $p < 0,01$ para FD e CN com $p < 0,01$ e SAO com $p < 0,05$ para ID (ANOVA, Tukey). Já na coleta de 30 dias o grupo SAM apresentou nível de danos significativo em relação ao CN com $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey) para ID e FD e em relação ao grupo SAO com $p < 0,001$ (ANOVA, Tukey) para FD e ID.

No fígado e córtex também foram avaliados ambos os parâmetros do ensaio cometa (ID e FD) nos três grupos tratados. No fígado, o grupo SAM apresentou nível de danos significativos em relação ao CN com, $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey) para ambos os parâmetros do ensaio cometa, e em relação ao grupo SAO, com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey), tanto para ID quanto para FD. Já no córtex o grupo SAM apresentou nível de danos estatisticamente significativos em relação aos grupos CN e SAO em ambos os parâmetros com $p < 0,01$ (ANOVA, Tukey).

Tabela 1: Detecção de danos em DNA de sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma crônica ao suco de *Lactuca sativa* L. cultivada (alface lisa) 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			
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	20,00 ± 6,73	
CN	ID	8,33 ± 8,09	9,17 ± 10,46	2,50 ± 2,51	1,00 ± 1,67	10,80 ± 9,96	74,60 ± 37,84	57,00 ± 21,20
	FD	6,67 ± 4,50	6,83 ± 3,19	6,00 ± 3,95	2,33 ± 2,42	3,00 ± 2,55	9,40 ± 6,43	24,50 ± 5,69
SAO	ID	8,17 ± 4,88	10,83 ± 5,12	8,00 ± 5,51	4,00 ± 3,80	3,80 ± 3,70	18,20 ± 15,99	64,00 ± 21,12
	FD	58,67 ± 13,40 ^{c,f}	23,00 ± 14,45 ^{b,d}	44,40 ± 13,22 ^{c,f}	10,00 ± 6,22 ^{b,e}	63,00 ± 15,92 ^{a,f}	49,33 ± 21,53 ^{a,e}	59,83 ± 20,61 ^{b,e}
SAM	ID	128,17 ± 43,51 ^{c,f}	57,75 ± 34,08 ^{b,e}	113,00 ± 34,96 ^{c,f}	14,00 ± 10,52 ^{b,d}	204,00 ± 66,43 ^{a,f}	165,83 ± 78,73 ^{a,e}	166,00 ± 59,09 ^{b,e}

CN = Controle Negativo, SAO = Suco de Alface Orgânico, SAM = Suco Alface Mina

FD = Frequência de Danos (%), ID = Índice de Danos (0 = sem danos; 400 = dano máximo), valores em Média ± Desvio Padrão.

^a = Diferença significativa em relação ao grupo CN com p < 0,05 (ANOVA, Tukey);

^b = Diferença significativa em relação ao grupo CN com p < 0,01 (ANOVA, Tukey);

^c = Diferença significativa em relação ao grupo CN com p < 0,001 (ANOVA, Tukey);

^d = Diferença significativa em relação ao grupo SAO com p < 0,05 (ANOVA, Tukey);

^e = Diferença significativa em relação ao grupo SAO com p < 0,01 (ANOVA, Tukey);

^f = Diferença significativa em relação ao grupo SAO com p < 0,001 (ANOVA, Tukey).

No teste de Micronúcleos foi utilizado o esfregaço de medula óssea de camundongos expostos e não expostos ao tratamento com suco de *Lactuca sativa* L. cultivada em horta experimental construída sobre depósitos de rejeitos de carvão. Neste ensaio foram avaliados dois parâmetros, toxicidade (relação EPC/ENC) e mutagenicidade (frequência de micronúcleos).

Os animais foram expostos ao tratamento por um período de 30 dias e a coleta foi realizada somente no 30º dia. Os resultados mostram que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados neste ensaio (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da mutagenicidade em camundongos expostos e não expostos ao tratamento aos sucos de hortaliças cultivadas em área de exploração de carvão, usando o Teste de Micronúcleos em medula óssea.

	MN EPC	MN ENC	EPC/ENC
CN	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,57 ± 0,04
SAO	0,17 ± 0,41	0,17 ± 0,41	0,77 ± 0,09
SAM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,61 ± 0,12

EPC = Eritrócitos Policromáticos, ENC = Eritrócitos Normocromáticos, MNEPC = Eritrócitos Policromáticos Micronucleados, MNENC = Eritrócitos Normocromáticos Micronucleados.

Valores avaliados em Média ± Desvio Padrão.

5 DISCUSSÃO

A mineração de carvão é uma atividade de exploração com alto potencial poluidor, pois o carvão contém uma mistura com mais de 50 elementos, incluindo os óxidos e outros elementos como sílica, HAPs, metais pesados e cinzas (LÉON et al., 2007).

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

Borges (2013) realizou um estudo para analisar o uso potencial de minhocas *Eisenia fetida*, como bioindicador de genotoxicidade em diferentes substratos remanescentes de mineração de carvão em processo de recuperação. Seus resultados demonstraram que a atividade mineradora, oferece contribuição aos elevados danos no DNA de celomócitos desta espécie. Assim como nos animais as plantas também podem ser danificadas quando expostas ao excesso de metais pesados em seu ambiente de crescimento (CARDOSO; NAVARRO; NOGUEIRA, 2003).

Grassi (2007) avaliou a genotoxicidade de *Baccharis trimera* (carqueja) de ocorrência em áreas degradadas pela mineração de carvão a céu aberto, administrando o extrato hidroalcoólico e o decocto dessa planta em camundongos, utilizando o teste do ensaio cometa em células sanguíneas e hepáticas como biomarcador. Neste trabalho foi possível observar que a utilização da carqueja de ocorrência em solo degradado pela mineração de carvão à céu aberto, pode provocar a produção de danos ao DNA em animais. Seus resultados corroboram com nosso trabalho indicando que plantas cultivadas em áreas com solo degradado pela mineração do carvão podem provocar danos ao DNA de animais.

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

Em nossos resultados observamos que o suco de alface cultivada em horta construída sobre depósito de rejeito de carvão, mesmo com todo o preparo da

terra com adubos e argila, se mostrou genotóxico quando ingerido de forma crônica. Demonstramos que os animais tratados com a hortaliça da mina apresentaram danos genéticos significativos quando comparados com as animais tratados com a hortaliça cultivada de forma orgânica e os tratados apenas com solução salina (controle negativo).

Já a algum tempo os biomarcadores, que são chamados também de sentinelas, vem sendo utilizados para prevenir a população sobre perigos ambientais (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003). O maior benefício na utilização biomarcadores em monitoramento ambiental, quando comparado com métodos tradicionais como os físico-químicos, são os dados referentes a exposição cumulativa nos organismos e/ou populações que ele fornece sobre a resposta de letalidade e sub-letalidade, e ainda aponta os efeitos indiretos (BROMENSHENK; SMITH; WATSON, 1995).

Visando o benefício da utilização dos biomarcadore, Leffa et al; (2010) expuseram moluscos *Helix aspersa*, a alface cultivada em horta experimental construída sobre depósito de rejeito de carvão e obtiveram resultados muito semelhante aos nossos resultados. Observaram que 48 horas após a exposição houve a maior concentração de danos com os valores mais altos de ID e FD, tendo após esse período ocorrido uma leve diminuição dos danos, mais ainda assim superiores significativamente aos animais do grupo controle, muito semelhante aos nossos resultados ao longo dos dias de coleta, onde houve bastante oscilação dos valores, mas sempre permanecendo significativamente elevados em relação aos CN e SAM.

Gonçalves (2012) expôs camundongos de forma aguda (com coletas em 3h, 6h e 24hs) ao suco de alface cultivada na mesma horta experimental que o nosso trabalho e demonstrou através do ensaio cometa em sangue periférico, fígado e córtex que o suco da alface da mina foi genotóxico em todas as horas de exposição, mas, semelhante ao nosso trabalho, o teste de micronúcleos não demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

Colaborando com nosso estudo utilizando plantas para avaliar a genotoxicidade Vilatoro-Pulido et al. (2008) através de uma planta consumida como fonte alimentícia demonstrou que os danos apresentados estavam associados a exposição de metais pesados (As, Pb e Cd) oriundos do solo de uma área próxima a mineradora. Eles observaram contaminação tanto nas raízes quanto nas partes

comestíveis da planta, constituindo-se em um risco para toda a cadeia alimentar, devido aos efeitos nocivos desses metais.

Segundo Prá et al. (2006) a contaminação ambiental contendo compostos como metais pesados é preocupante, pois os mesmos tem alta toxicidade, capacidade de bioacumulação e potencialidade de induzir danos ao material genético. A toxicidade de metais e seus compostos dependem de sua biodisponibilidade, ou seja, dos mecanismos de captação através de membranas celulares, distribuição intracelular e ligações a macromoléculas celulares. Compostos metálicos podem alterar o crescimento celular através de mecanismos distintos. Alterações na regulação dos genes são observadas antes de uma possível manifestação de tumores, que podem não ser fixadas por mutações, sendo necessário um tempo 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).

Nossos resultados apresentaram diferenças entre os dois testes, provavelmente devido ao fato de os testes utilizados serem diferentes. O ensaio cometa detecta lesões no DNA que podem ser reparados, enquanto que o teste de micronúcleos detecta danos irreversíveis no DNA ou efeitos aneugênicos que não mais podem ser reparados. O teste de micronúcleos e o ensaio cometa de fato são distintos, cada um com suas vantagens e restrições, por isso eles são usados em conjunto para avaliar danos genéticos. Danos mensurados pelo ensaio cometa aparecem mais cedo do que o micronúcleo, que requer divisão celular para ser visualizado. Nem sempre a formação de micronúcleos acontece na primeira divisão celular, pois um fragmento acêntrico pode sobreviver replicar e se transformar em um micronúcleo em divisões subseqüentes (SOUZA, 2005). O ensaio cometa por ser uma técnica muito sensível, deve ser aplicado com bastante cuidado para que não haja interpretações equivocadas dos resultados obtidos, e tais dados podem ser relevantes na avaliação dos riscos que essas populações expostas a mineração estejam sujeitas (SANTOS, 1999). Em nossos resultados podemos observar que após o término do tratamento, os danos causados ao DNA foram reparados e devido a este fato não obtivemos diferenças significativas no Teste de Micronúcleos.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o consumo de hortaliças cultivadas sobre área de depósito de rejeito de carvão apresenta alto potencial genotóxico, podendo gerar um risco considerável a saúde humana e também a animais que vivem próximos a essas áreas, e se alimentam dessas mesmas hortaliças, pelo fato de estarem ao seu alcance.

Contudo estudos adicionais são necessários para averiguar os resultados obtidos neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ANEEL. **Carvão Mineral**, 2008. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br.html>>. Acesso em: 07 abr. 2012.
- 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.
- BEYERSMAMM, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of toxicology**, v. 82, p. 493-512, 2008.
- BROMENSHENK, J.J.; SMITH, G. C.; WATSON, V.J. Assessing ecological risks in terrestrial systems with honey bees. In: Butterworth, B.E.; Corkum, L. D.; Guzmán-Rincón, J. **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**, New York: Plenum Press, 1995, p. 9-30.
- BORGES, G. D. **Bioindicação através da *Eisenia fetida* em substratos do Campo Morozini, Treviso, Santa Catarina, Brasil**. 2013. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.
- BROWN, R. E. Significance of trace metals and nitrates in sludge soils. **Journal WPCF**, v. 47, n. 12, p. 2863-2875, 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 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.
- 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.

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

FREITAS, M.; ZOCHE, J.J; ESSEMAM DE QUADROS, K. Metais pesados (Mn e Zn) em *Typha domingensis* Pers. em áreas de mineração de carvão. **Revista Brasileira de Biociências**. 2007.

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

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

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.

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.

HORBACH, R. et al. Geologia. In: **Levantamento de recursos naturais. 33**: Folha SH.22 Porto Alegre e parte das Folhas SH.21 Uruguaiana e SI.22. Rio de Janeiro: SEPLAN; IBGE, 1986.

KLEIN, A.S. **Áreas degradadas pela mineração de carvão no Sul de Santa Catarina**: vegetação versus substrato. [Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais] .Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma, 2006.

KHAN, S.; CAO, Q.; ZHENG, Y.M.; HUANG, Y.Z.; ZHU , Y.G. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 686-692, 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.

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.

LIMA, C.V.S. de. **Potencial de fitoextração do nabo forrageiro e da aveia preta**

em argissolo contaminado por cádmio. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LOPES, A.M.A. L. **Avaliação do risco de contaminação ambiental utilizando como bioindicador o ratinho-caseiro (*Mus Musculus*).** [Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente]. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2009.

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**, Oak Ridge, v. 239, p. 29-80, jul. 1990.

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.

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

PRÁ, D.; GUECHEVA, T.; FRANKE, S. I. R.; KNAKIEVICZ, T.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.1, n.2, p.171-175, 2006.

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, I.C.; CASALI, V.W.D.; MIRANDA, G.V. Teores de metais pesados, K e Na, no substrato, em função de doses de composto orgânico de lixo urbano e de cultivares de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 415-421, 1999.

SCHINS, R. P.F.; BORM, P. J. A. Mechanisms and Mediators in Coal Dust Induced Toxicity: A Review. **Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved**, PII: S0003, v.4878, 1999.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 2003, p 424.

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

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.

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.

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**, v. 35, p. 206-221, 2000.

VILLATORO-PULIDO, M.; FONT, R.; HARO-BRAVO, M. I. De; ROMERO-JIMÉNEZ, M.; ANTER, J.; BAILÓN A. De H.; ALONSO-MORAGA Á.; RIO-CELESTINO, M. D. Modulation of genotoxicity and cytotoxicity by radish grown in metal-contaminated soils. **Mutagenesis Advance Access published September**, v.28, 2008.

VILLELA et al. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.p 158-159.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.DE.; SILVA, J.DA.; HENRIQUES, J. A.P. 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**, v. 21, p. 76-80, 2002.

ZOCHE, J. J. ; LEFFA, D.D. ; DAMIANI, A.P. ; CARVALHO, F. ; MENDONÇA, R. Á; SANTOS, C.E.L. dos ; 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** (impresso), New York, N.Y.. 2010. (b).

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: SOBRAGE, 2005.