

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

GIULIA DOS SANTOS PEDROSO

**MORCEGOS DA BACIA CARBONÍFERA CATARINENSE COMO ESPÉCIES
SENTINELAS AOS EFEITOS NOCIVOS AO PULMÃO INDUZIDOS PELA
EXPOSIÇÃO AO CARVÃO MINERAL**

CRICIÚMA

2015

GIULIA DOS SANTOS PEDROSO

**MORCEGOS DA BACIA CARBONÍFERA CATARINENSE COMO ESPÉCIES
SENTINELAS AOS EFEITOS NOCIVOS AO PULMÃO INDUZIDOS PELA
EXPOSIÇÃO AO CARVÃO MINERAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino Pinho

Co-Orientador: Prof. Dr. Jairo José Zocche

CRICIÚMA

2015

GIULIA DOS SANTOS PEDROSO

**MORCEGOS DA BACIA CARBONÍFERA CATARINENSE COMO ESPÉCIES
SENTINELAS AOS EFEITOS NOCIVOS AO PULMÃO INDUZIDOS PELA
EXPOSIÇÃO AO CARVÃO MINERAL**

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 Manejo de Recursos Naturais.

Criciúma, 22 de Junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ricardo Aurino Pinho –Dr.–(UNESC) - Orientador

Prof. Vanessa Moraes de Andrade–Dra. (UNESC)

Prof. Paula Rohr–Dra. - (UNESC)

Dedico a minha família, meu marido e principalmente a Deus, por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela minha vida, minha família, meus amigos e por chegar até aqui.

Aos meus pais Claudio e Marlene, pelo incentivo constante aos estudos, pelo amor e por tudo que me proporcionaram até hoje, amo vocês!

Aos meus avós, Artur e Maria, por serem os melhores avós do mundo, em todos os sentidos, por me fazer acreditar que sim, todos os meus sonhos são possíveis, basta acreditar e correr atrás. Minha admiração eterna por vocês.

Ao meu marido Filipe, por me amar, me aturar (o que não deve ser fácil), por compreender minhas ausências nesses últimos meses, por me fazer sorrir, mesmo quando tudo parece difícil, por estar aqui comigo. Eu te amo!

A minha melhor amiga, Daiana, por sempre estar ao meu lado pra me fazer esquecer tudo, com nossos cabelos coloridos, dias de modelo, seriados sem fim, coisas de comadres, entre tantas outras coisas em comum. Todo amor do mundo pra ti!

Aos amigos e companheiros de laboratório Marcela, Fernanda, Stella, Lara, Gustavo, Jonathan, Luise, Claudia, Carol por ter me ajudado nas técnicas bioquímicas, ter ficado comigo no laboratório até duas horas da manhã e ter me aturado, em especial neste semestre, o que deve ter sido muito difícil com minhas constantes alterações de humor. Mas em especial meu agradecimento a Hemelin, por estar comigo desde a primeira coleta em um lugar sem luz, sem televisão, sem internet, sem celular, chovendo, durante quatro dias. Isso não é apenas coleguismo, é Amizade!

Aos professores, Jairo, Fernando e Ivan por me auxiliarem nas coletas e em toda orientação sobre impacto ambiental deste trabalho.

Aos professores Pauline e Paulo por me auxiliarem com seus conhecimentos em Bioquímica e por terem trabalhado junto comigo na realização deste trabalho, em especial a Renata por ter me auxiliado de forma precisa na análise dos resultados e elaboração do trabalho final.

Mas, meu agradecimento especial ao meu orientador Ricardo, por esses três anos de orientação, paciência, compreensão, conhecimentos a mim passados, não somente de Bioquímica, mas de experiências de vida. Você é minha inspiração.

**“Queira, basta ser sincero e desejar profundo,
você será capaz de sacudir o mundo.”**

Raul Seixas

RESUMO

O carvão é uma complexa e variada mistura de componentes orgânicos e sólidos, de grande importância na matriz energética mundial, apesar dos graves impactos que causa ao meio ambiente. Atualmente, muitos campos de mineração já não se encontram mais ativos, entretanto, o término da lavra não significa o fim do processo poluidor, nem o esgotamento da fonte geradora de poluição. O objetivo deste trabalho foi verificar as possíveis alterações nos parâmetros de estresse oxidativo no pulmão de morcegos da Bacia Carbonífera Catarinense. Foram coletadas duas espécies de morcegos (*Artibeus lituratus* e *Sturnira lilium*) em área controle (livre de contaminação) e em área minerada. Para análise de parâmetro de estresse oxidativo foram analisadas produção de oxidantes, enzimas antioxidantes e danos oxidativos. Os resultados referentes à produção de oxidantes demonstraram um aumento de ERO no grupo referente a área minerada da espécie *Sturnira lilium* quanto aos níveis de DCF comparado com área controle da mesma espécie. Na espécie *Artibeus lituratus*, o grupo referente a área minerada apresentou diminuição significativa nos níveis de Nitrito comparado com a área controle da mesma espécie. Quanto a atividade das enzimas antioxidantes foi possível observar que a atividade da SOD não apresentou resultados significativos, entretanto, a atividade da CAT e conteúdo de GSH apresentaram diminuição na espécie *Artibeus lituratus* de área minerada quando comparado a área controle. O dano oxidativo avaliado pelos níveis de tióis totais apresentaram redução significativa na espécie *Artibeus lituratus* de área minerada quando comparado a área controle. A partir dos dados obtidos, sugerimos que os morcegos, em especial *Artibeus lituratus* que vivem em áreas de mineração da Bacia carbonífera Catarinense podem ser utilizados como biomonitorios aos efeitos nocivos ao pulmão induzidos pela exposição ao carvão mineral.

Palavras chave: Carvão, Impactos ambiental, Biomonitorios, Morcegos, Estresse Oxidativo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica

CAT - Catalase

CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPRM – Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais

DCF – DA - 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DTNB - Ácido 2-nitrobenzóico

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GSH- Glutathiona Reduzida

HAP - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

HCl- Ácido Clorídrico

MP – Material Particulado

NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

NM - Nanômetro

NO – Óxido Nítrico

ROS – Reactive Oxygen Species

RPPN – Reserva Particular do Patrimônio Natural

S – South (sul)

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SOD – Superóxido Dismutase

W – West (oeste)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1IMPACTOS AMBIENTAIS CAUSADOS PELA MINERAÇÃO DE CARVÃO	11
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	17
3.2 COLETA DOS ANIMAIS	18
3.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	19
3.3.1 Produção de Oxidantes	19
3.3.2 Sistema de defesa antioxidante.....	20
3.3.3 Danos Oxidativos	20
3.3.4 Conteúdo de Proteína.....	21
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	21
4 RESULTADOS	22
4.1 PRODUÇÃO DE OXIDANTES.....	22
4.2 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	23
4.3 DANOS OXIDATIVOS.....	23
6 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS.....	34

1 INTRODUÇÃO

O carvão é uma complexa e variada mistura de componentes orgânicos sólidos, fossilizados ao longo de milhões de anos, como ocorre com todos os combustíveis fósseis. Em termos de participação na matriz energética mundial, segundo o balanço energético de 2003, o carvão é atualmente responsável por cerca de 7,9% de todo o consumo mundial de energia e de 39,1% de toda energia elétrica gerada. No âmbito mundial apesar dos graves impactos sobre o meio ambiente, o carvão ainda é uma importante fonte de energia por: abundância de reservas, distribuição geográfica das reservas, baixos custos e estabilidade nos preços, relativamente a outros combustíveis (ANEEL, 2015).

Segundo Farias 2002, a mineração é um dos setores básicos da economia do país, contribuindo de forma decisiva para o bem estar e a melhoria da qualidade de vida das presentes e futuras gerações, sendo fundamental para o desenvolvimento de uma sociedade equânime, desde q seja operada com responsabilidade social, estando sempre presente os preceitos do desenvolvimento sustentável. A mineração, evidentemente, causa um impacto ambiental considerável. Ela altera intensamente a área minerada e as áreas vizinhas, onde são feitos os depósitos de estéril e de rejeito. Além do mais, quando tem se a presença de substâncias químicas nocivas na fase de beneficiamento do minério, isto pode significar um problema sério do ponto de vista ambiental (SILVA, 2007).

No estado de Santa Catarina as reservas concentram-se numa área alongada no sentido norte/ sul, situada entre os municípios de Araranguá e Lauro Müller, com 70 km de comprimento por 15- 20 km de largura (CAMPOS et al., 2003). A exploração do carvão no estado é feita tanto em minas subterrâneas como a céu aberto. Ambos os processos podem acarretar problemas ambientais, seja por modificarem a estrutura do meio natural, pela deposição inadequada dos resíduos da mineração, causando contaminação das águas superficiais e subterrâneas ou perda de solo fértil, seja por promover a contaminação na atmosfera nas proximidades das minas, pela geração de gases e material particulado (MP) (SANCHEZ e FORMOSO, 1990).

1.1 IMPACTOS AMBIENTAIS CAUSADOS PELA MINERAÇÃO DE CARVÃO

Assim como qualquer outro tipo de exploração de recursos naturais a mineração de carvão causa impactos ambientais, tanto pela modificação do ambiente em que esta sendo realizada, quanto pela geração de resíduos tóxicos ao meio ambiente. Os principais problemas gerados pela mineração segundo a Companhia de Pesquisa e Recursos Naturais (CPRM, 2015) são: poluição da água, poluição do ar, poluição sonora, movimento da superfície do terreno, incêndios causados pelo carvão e rejeitos radioativos.

O carvão tem sido descrito como o mais significativo poluente de todas as energias fósseis, 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).

Na mineração de carvão, exige-se a retirada das camadas suprajacentes de solo, quando a mineração é feita a céu aberto, assim as camadas retiradas, que antes possuíam distintas características físicas, químicas e mineralógicas, acabam sendo reunidas em um único conjunto indistintamente misturado. Isso tem como consequência à existência nestes solos de restos de carvão que não foram utilizados juntamente com seus constituintes menores e metais pesados (SOARES e MELLO, 1997).

Na lavra em subsuperfície (subterrânea) os impactos ambientais são menos visíveis, mas, não menos significativos do ponto de vista ambiental. Os principais impactos estão associados à subsidência (afundamento ou colapso da cobertura da câmara) do terreno, rebaixamento do lençol freático (com extinção de fontes), reflexo na rede hidrológica superficial, geração de gases (destaca-se por sua periculosidade o metano) e vibrações (devido às explosões) (MINISTÉRIO PÚBLICO FEDERAL, 2006).

A exploração do carvão em Santa Catarina é feita em minas subterrâneas e a céu aberto, na qual a profundidade da camada carbonífera é critério para seleção entre um ou outro método de lavra. Sendo que a lavra subterrânea é utilizada quando a jazida de carvão se encontra em camadas mais profundas (cerca de 30m até aproximadamente 120 m) e a lavra a céu aberto é utilizada, quando a jazida de carvão se encontra próxima à superfície do solo até, aproximadamente, 30m de profundidade (KLEIN, 2006).

Nos dias atuais, muitos campos de mineração já não se encontram mais ativos, mas infelizmente, o término da lavra não significa o fim do processo poluidor, nem o esgotamento da fonte geradora de poluição, pois, os rejeitos carboníferos oriundos do

processo, os quais compõem o passivo ambiental gerado, continuam reativos por muito tempo, disponibilizando íons metálicos (As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Al, Cr, Mn, Co, entre outros) comprometendo assim, o restabelecimento das comunidades vegetais terrestres e aquáticas (ZOCICHE, 2005).

Monitorar o impacto ambiental e os possíveis danos a saúde humana, é problemático devido principalmente a complexidade e ao custo decorrente da identificação das substâncias químicas envolvidas, também, pelo fato de que os organismos na natureza não estão expostos a um único composto, e sim, a uma complexa mistura destes, gerando um problema na qual, estudos epidemiológicos falham no que se refere à estipulação do tempo, pois algumas anomalias necessitam de um longo período de exposição e condições de exposição para se expressarem (TICE, 1995).

Além disso, a inalação da poeira gerada pela extração e deposição dos rejeitos do carvão, pode provocar distúrbios orgânicos significativos, principalmente os de ordem respiratória, que podem levar os indivíduos a um estado de morbidez e diminuição da expectativa de vida (PINHO et al., 2004).

1.2 CARVÃO MINERAL E DANOS PULMONARES

Os trabalhadores da indústria carbonífera são comumente expostos à poeira do carvão e aos seus contaminantes, como metais pesados, quinonas, entre outros (LI et al., 2008), o que pode causar severas doenças ocupacionais. Em adição, o depósito de rejeitos a partir da extração do carvão sobre solo em áreas não tratadas, também promove agravos à saúde da população. De acordo com Mossman (2003), após a inalação de poluentes atmosféricos, os pulmões são os primeiros alvos atingidos pela produção de oxidantes durante a combustão de oxigênio.

Estudos têm sugerido que, após a exposição a partículas industriais ocorrem significativas alterações bioquímicas pulmonares. Especificamente, o carvão mineral, além dos elementos tóxicos presentes em sua composição, possui outros componentes agregados durante a extração, como a sílica e o ferro por exemplo. Estes, depois de inalados, podem alterar tanto a estrutura física quanto a fisiologia pulmonar (TAO et al., 2003). O principal mecanismo de indução de dano pulmonar por depósito de partículas industriais é, provavelmente, mediado por ativação de macrófagos e recrutamento de células

polimorfonucleares. Esse processo ativa mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO), que promovem estresse oxidativo local e sistêmico e com conseqüente efeitos deletérios sobre o tecido pulmonar (MOSSMAN, 2003, PINHO et al., 2005).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

No organismo, a produção de ERO possui fundamental papel na fisiologia celular. Embora os processos de oxidação sejam importantes para a sobrevivência das células, a produção excessiva de ERO pode levar ao estresse oxidativo (HALLIWELL E GUTRIDGE, 2007).

O estresse oxidativo é uma resposta geral à toxicidade induzida por vários contaminantes. Muitas substâncias químicas promovem o estresse oxidativo a partir de um elevado estado oxidativo celular, bem como a inibição do sistema de defesa oxidante (FALFUSHINSKA et al., 2008), e se caracteriza portanto como desequilíbrio entre a produção de oxidantes e antioxidantes. Embora esse fenômeno bioquímico, quando ocorre em baixo estado de oxidação, seja necessário ao desenvolvimento dos organismos celulares, níveis severos de oxidação levam a lesão de biomoléculas incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lípidos de membrana e conseqüente morte celular (FOLCHINI, 2007).

As substâncias oxidantes dividem-se em dois grandes grupos: Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERO são formadas pela redução univalente do oxigênio molecular, sendo um processo mediado por enzimas em diferentes processos celulares como em uma resposta inflamatória ou em isquemia e reperfusão tecidual ou por reações não enzimáticas como a partir da transferência de elétrons, da redução da ubiquinona para semi-ubiquinona, componentes da cadeia transportadora de elétrons. Nesses casos, o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila estão entre as ERO mais presentes nas células e desenvolvem uma reação em cadeia que altera o estado redox da célula (HALLIWELL E GUTTRIDGE, 2007). Adicionalmente, as ERN são derivadas do metabolismo do óxido nítrico (NO), também são importantes e tem o peróxinitrito como o principal metabólito envolvido em diversos processos biológicos (SUN, 2003).

Após a exposição ao carvão, o aumento na quantidade de fagócitos no pulmão, causa uma produção local de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Na presença de

ferro, o peróxido de hidrogênio é convertido em radical hidroxil pela reação de Fenton (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007). De acordo com Kim et al. (2000), a quantidade de ferro em partículas minerais pode ser o principal mediador de toxicidade e dos danos oxidativos sobre o pulmão. Adicionalmente, o superóxido é também um inibidor da alfa-1-antitripsina, uma importante glicoproteína que inibe a ação de várias proteases, incluindo elastases. Esse desequilíbrio entre antiproteases-proteases pode levar à destruição tecidual e a enfisema pulmonar (RAHMAN et al., 2001) e desencadear uma resposta inflamatória tecidual persistente e isso leva a mais lesões endoteliais, recrutamento de neutrófilos, ativação de mediadores inflamatórios e danos em biomoléculas (PINHO et al., 2005).

1.4 MORCEGOS COMO ESPÉCIES SENTINELAS BIOMONITORAS

Biomonitores, também conhecidos como organismos sentinelas, vêm sendo utilizados há muito tempo para alertar as pessoas sobre ambientes perigosos. Na seleção de um biomonitor os principais aspectos a serem observados são: (a) os animais devem dividir o mesmo ambiente com o homem; (b) responder de forma semelhante a químicos tóxicos; e (c) desenvolver patologias similares como resposta a estes efeitos (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003). Neste sentido, a utilização desses sentinelas é uma ferramenta importante para compreender os efeitos biológicos sobre a saúde animal e humana, bem como sobre o ecossistema.

A investigação dos riscos deletérios a que a população humana está exposta pode ser desenvolvida de forma indireta, isto é, por meio de estudos com outros organismos de topo de cadeia por meio da avaliação de danos oxidativos fornecendo assim, indicação da contaminação da cadeia alimentar (ZOCCHÉ, 2005).

Para áreas de mineração de carvão, morcegos podem ser usados como biomonitores de riscos à saúde humana, pois estes animais estão no mesmo nível trófico na cadeia alimentar que os seres humanos (JONES et al., 2009). É provável que alguns possam acumular metais pesados e outros elementos tóxicos a partir de fontes de mineração por exposição ao longo da cadeia alimentar (O'SHEA et al., 2001).

Morcegos que vivem em áreas de mineração de carvão podem, portanto, ser um ótimo indicador ecológico do risco potencial que as populações humanas que vivem em tais

áreas estão submetidas, sobretudo, pela acumulação de determinados elementos não essenciais e potencialmente tóxicos em seus tecidos (CLARK et al., 1982).

2OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar as possíveis alterações nos parâmetros de estresse oxidativo no pulmão de morcegos da Bacia Carbonífera Catarinense.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

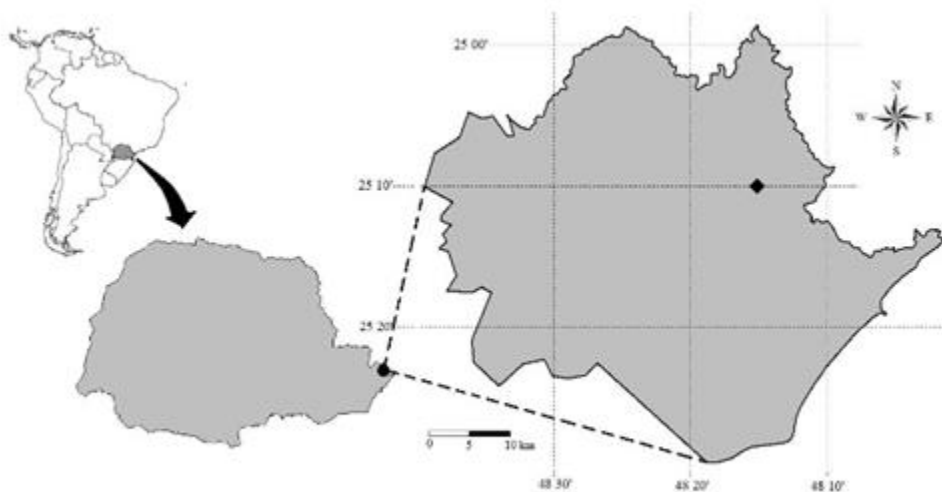
- Avaliar a produção de oxidantes em pulmões de morcegos de áreas mineradas de carvão da bacia carbonífera catarinense e em área livre da influência da contaminação atmosférica por mineração;
- Avaliar o sistema de defesa antioxidante enzimático em pulmões de morcegos de áreas mineradas de carvão da bacia carbonífera catarinense e em área livre da influência da contaminação atmosférica por mineração.
- Avaliar os danos oxidativos em proteínas em pulmões de morcegos de áreas mineradas de carvão da bacia carbonífera catarinense e em área livre da influência da contaminação atmosférica por mineração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

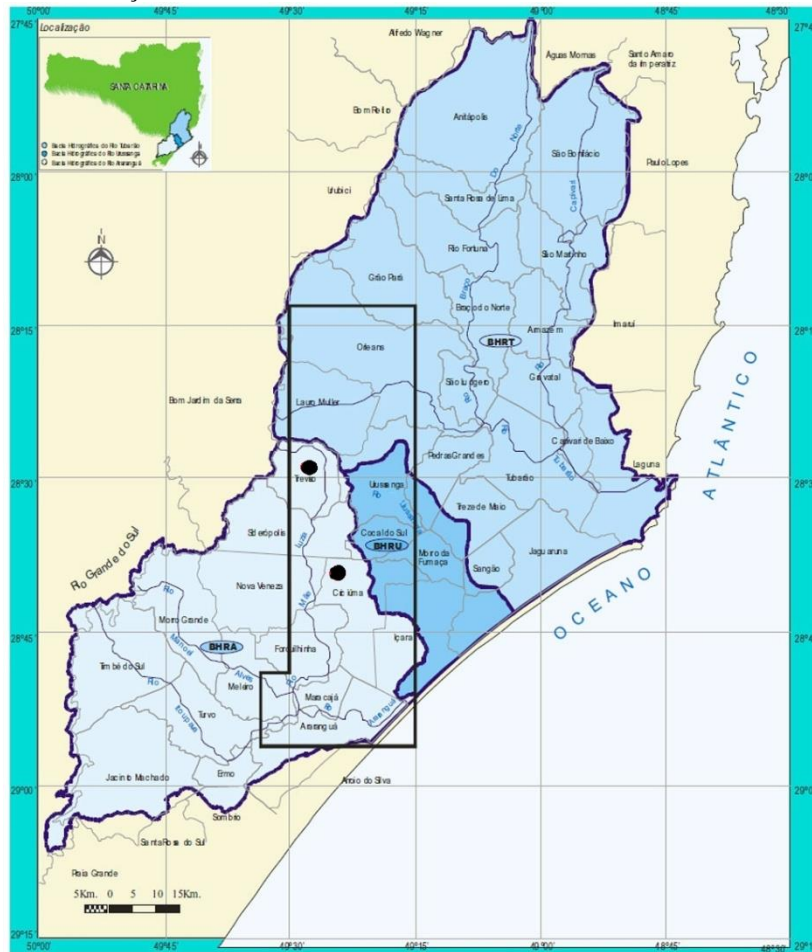
O estudo foi realizado em duas regiões do Sul do Brasil sendo, uma livre de contaminação por atividades de carvão (área controle) e outra sob influência de atividades de mineração (área minerada). As coletas na área controle ocorreram no município de Guarequeçaba localizado na região norte do litoral Paranaense ($25^{\circ} 10'S$ e $48^{\circ} 15'W$), na Reserva Natural Salto Morato da Fundação Boticário (Figura 1). As coletas em área minerada ocorreram na Bacia Carbonífera Catarinense nos municípios de Treviso ($28^{\circ}30'56'' S$ e $49^{\circ}27'27'' W$) e Criciúma ($28^{\circ}40'39'' S$ e $49^{\circ}22'11'' W$) (Figura 2), ambos com existência de mineração de carvão.

Figura 01: Mapa da localização da área de estudo, onde (●) localização do município de Guarequeçaba; (◆) localização da RPPN Reserva Natural Salto Morato no referido município.



FONTE: Carvalho, 2012.

Figura 02: Localização dos municípios da Bacia Carbonífera Catarinense, sendo (●) os municípios escolhidos para coleta em área de mineração.



FONTE: Justiça Federal, 2008.

3.2 COLETA DOS ANIMAIS

Para esse estudo, foram capturadas duas espécies de morcegos sendo elas: *Artibeus lituratus* Olfers, 1818 e *Sturnira lilium* E. Geoffroy, 1810, todos da família Phyllostomidae, sob licença do SisBio número: 46623-1. A seleção das espécies para análise foi baseada no tipo de dieta (exclusivamente frugívoros) e abundância nas duas áreas de coleta.

Para a captura foram utilizadas seis redes de neblina, todas instaladas ao nível do solo em possíveis corredores de voo. As redes foram instaladas ao entardecer e abertas com o crepúsculo. Após a captura, os indivíduos foram acondicionados individualmente em sacos de algodão devidamente identificados, sexados e tiveram seus dados biométricos tomados.

Indivíduos jovens e fêmeas prenhes ou em estado de lactação não foram incluídos no estudo sendo imediatamente liberados. Foram capturados em área controle 4 morcegos da espécie *Artibeus lituratus* e 4 da espécie *Sturnira lilium* e na área minerada 6 da espécie *Artibeus lituratus* e 10 da espécie *Sturnira lilium*. Com isso utilizamos um n=4 para morcegos de área controle e um n=6 para morcegos de área minerada. Em um período máximo de uma hora após as capturas, os animais foram submetidos à eutanásia (Licença CEUA n° 063 – 2014 – 02) e os lóbulos pulmonares rapidamente retirados e conservados sob refrigeração de -80 °C até o momento das análises.

Os ensaios bioquímicos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (LAFIBE) da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

3.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

3.3.1 Produção de Oxidantes

Óxido Nítrico (NO) produzido foi estimado espectrofotometricamente como nitrito formado (NO₂). Para medir o teor de nitrito, as amostras foram incubadas com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 0,1 mol/L de HCl e 0,1% de N-(1-naftil) (etilenodiamina, dicloridrato) à temperatura ambiente durante 10 min. Em seguida, a absorvância foi medida a 540nm usando um leitor de microplacas (GREEN et al., 1982).

A produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi avaliada utilizando o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (LEBEL, 1990), com algumas modificações. Após a preparação de homogenatos, as amostras foram incubadas com 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (10 uM) a 37°C durante 30 minutos, e a formação foi cessada a 4°C. DCFH-DA foi desesterificado no interior das células por esterases endógenas para o ácido livre ionizado. DCF-DA foi então oxidado por hidroperóxidos. A formação do derivado fluorescente oxidada (DCF-DA) foi monitorado com excitação e emissão de comprimentos de onda de 488 e 525 nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência SpectraMax (Califórnia, EUA).

3.3.2 Sistema de defesa antioxidante

Superóxido dismutase (SOD): Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister & Calabrese (1987). As amostras de pulmão foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15 μ L foram retirados da mesma, a qual 5 mL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185mL (0,75g em 200 mL de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 μ L adrenalina (60mM em água destilada +15mL/mL de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

Catalase (CAT): Foi determinada com base na taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) presente na amostra, utilizando uma solução de H₂O₂ a 10mM em tampão de fosfato de potássio (50mM), pH 7,0 (Aebi, 1984). Dois mililitros da solução de H₂O₂ e 20mL foram colocadas numa cuvete de quartzo. Após a homogeneização, a taxa de decomposição de H₂O₂ máxima foi medida num espectrofotometro a 240nm e os valores foram expressos como unidades de catalase/mg de proteína.

Glutathione (GSH): Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin & Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado em homogenato de pulmão após precipitação de proteína com 1mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 μ M DTNB. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathione reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.3.3 Danos Oxidativos

O conteúdo total de tióis foi determinado usando o método 5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (Sigma, St. Louis, MO). A reação foi iniciada pela adição de 30 μ L de DTNB 10 mM e soro fisiológico tamponado com fosfato. As amostras de controle não incluíram DTNB. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorbância a

412nm foi medida, e a quantidade de DTNB formado foram calculados (equivalente à quantidade de grupos de tiol), usando a técnica desenvolvida por Aksenov e Markesberya (2001).

Para avaliar os níveis de MDA, foi utilizado o protocolo segundo Grotto (2006), onde as amostras de pulmão foram homogeneizadas em tampão Fosfato de Sódio com KCl, sendo logo após centrifugadas à 1500 giros por 10 minutos, com refrigeração de 4°C. Do sobrenadante foram retirados 75uL e adicionado mais 25uL de água e 25uL de NaOH 3N e incubado a 60°C por 30 minutos em banho Maria com a água em movimento. Logo após, foi adicionado 125uL de H₃PO₄ 6% e 125uL de TBA 0,8% e colocado novamente em banho Maria com a temperatura em 90°C por 45 minutos. Após esse tempo é adicionado 50uL de SDS 10% e mais 300uL de n-butanol, levando as ao vórtex por 1 minuto. Em seguida foram centrifugadas á 3000g por 10 minutos. Destes sobrenadantes foram retirados 20uL e injetados no HPLC.

3.3.4 Conteúdo de Proteína

Alíquotas de homogeneizados pulmonares foram utilizadas para os ensaios bioquímicos e análise de parâmetros de estresse oxidativo por métodos de espectrofotometria e normalizados a partir da quantidade de proteína total (BRADFORD, 1976).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por teste t-*Student* pareado, aceitando o valor de significância menor ou igual a 0,05 como estatisticamente significativos. O software utilizado para a análise dos dados foi o Graph Pad Prisma versão 5.0 para Microsoft Windows.

4 RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO DE OXIDANTES

Os resultados na Figura 3A demonstram um aumento significativo de DCFH no grupo de área minerada na espécie *Sturnira lilium* em comparação ao grupo controle da mesma espécie. Para a espécie *Artibeus lituratus* não se obteve resultados significativos. A Figura 3B demonstra uma diminuição significativa dos níveis de Nitrito nos pulmões do grupo de área minerada da espécie *Artibeus lituratus*. Para a espécie *Sturnira lilium* não se obteve resultados significativos.

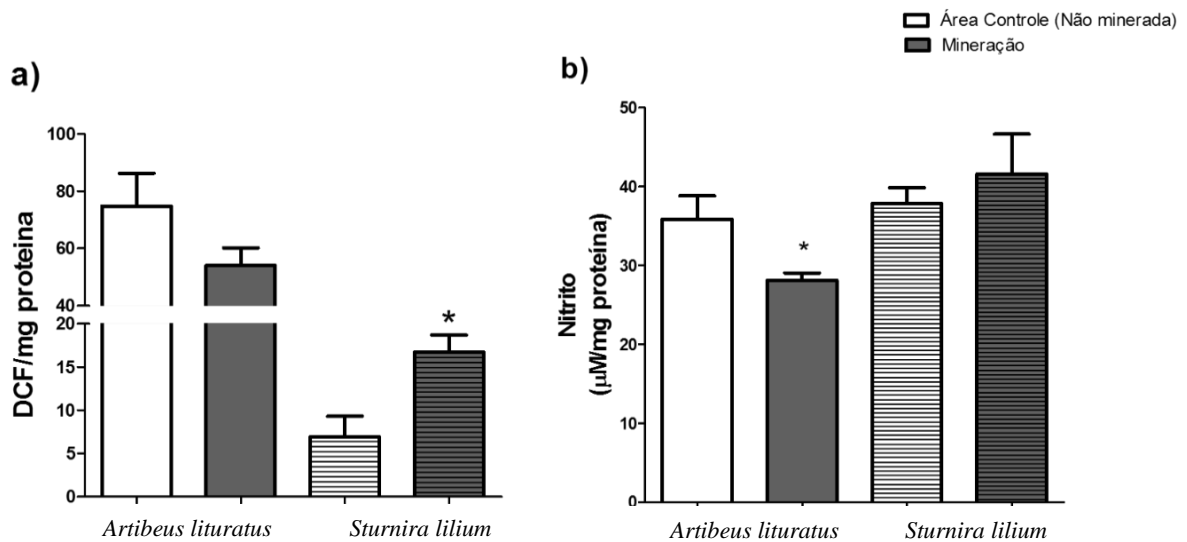


Figura 03: Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio frente à exposição ao carvão mineral avaliado pelos níveis de DCF (A) e de NO (B) em homogeneizado pulmonar de *Artibeus lituratus* e *Sturnira lilium* em área controle (não minerada), comparada a área com mineração de carvão. *t-test Student* foi utilizado para quantificar a diferença estatística entre os grupos de cada espécie, * significa, que os dados são estatisticamente diferentes do grupo controle de cada espécie: controle *Artibeus lituratus* ou do grupo controle - *Sturnira lilium*.

4.2 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Os resultados na Figura 4A, referente à atividade da SOD, não foram estatisticamente significativos. Na figura 4B e 4C tanto a atividade da Catalase, quanto o conteúdo de Glutaciona total tiveram redução significativa no grupo de área minerada em comparação ao grupo controle para a espécie *Artibeus lituratus*, não sendo significativa para a outra espécie.

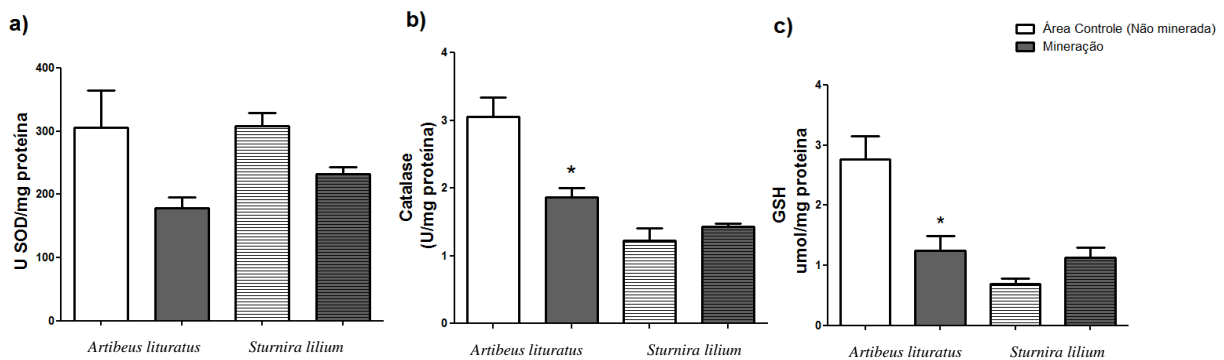


Figura 4: Sistema de defesa antioxidante frente à exposição ao carvão mineral avaliado pela atividade da SOD (A), atividade da Catalase (B) e Glutaciona Total (C) em homogeneizado pulmonar de *Artibeus lituratus* e *Sturnira lilium* em área controle (não minerada), comparada a área com mineração de carvão. *t-test Student* foi utilizado para quantificar a diferença estatística entre os grupos de cada espécie, * significa, que os dados são estatisticamente diferentes do grupo controle de cada espécie: controle *Artibeus lituratus* ou do grupo controle - *Sturnira lilium*.

4.3 DANOS OXIDATIVOS

Na figura 5A a quantidade de MDA foi maior tanto em *Artibeus lituratus* quanto em *Sturnira lilium* de área minerada quando comparado ao respectivo grupo controle (área não minerada). Na figura 5B os níveis de tióis totais obtiveram uma redução significativa no grupo de área minerada em relação ao grupo controle na espécie *Artibeus lituratus* não sendo significativo para *Sturnira lilium*.

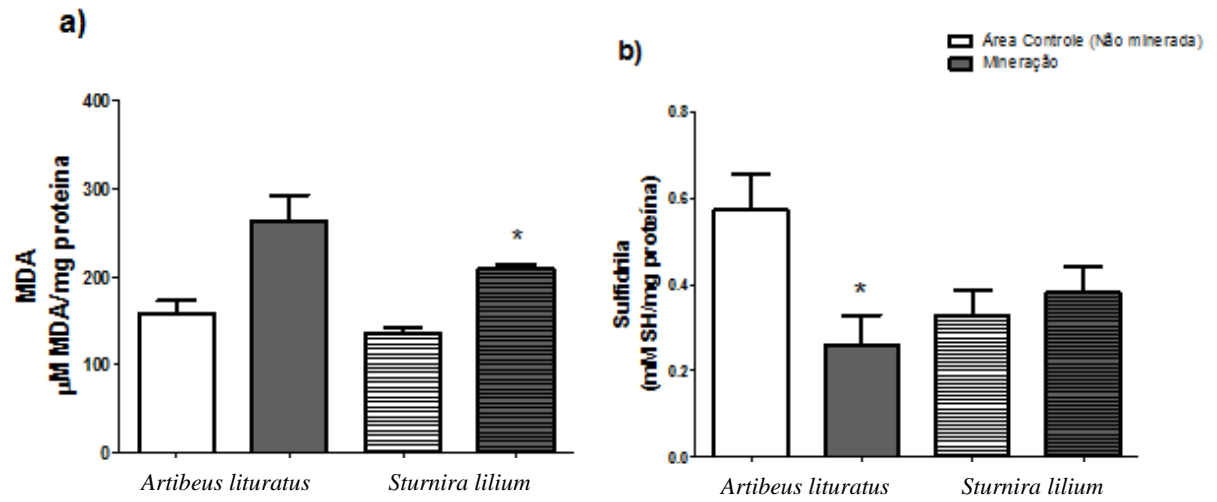


Figura 05: Danos oxidativos frente à exposição ao carvão mineral avaliado pelo MDA (A) e conteúdo total de tiol (B) em homogeneizado pulmonar de *Artibeus lituratus* e *Sturnira lilium* em área controle (não minerada), comparada a área com mineração de carvão. *t-test Student* foi utilizado para quantificar a diferença estatística entre os grupos de cada espécie, * significa, que os dados são estatisticamente diferentes do grupo controle de cada espécie: controle *Artibeus lituratus* ou do grupo controle - *Sturnira lilium*.

5 DISCUSSÃO

Impacto ambiental, segundo a resolução do CONAMA n° 1/86, art. 1, é qualquer alteração das propriedades físicas, químicas ou biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas, que direta ou indiretamente afetem: a saúde, a segurança e o bem estar da população; as atividades sociais e econômicas; as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; a qualidade dos recursos ambientais. Neste sentido, a atividade da mineração de carvão tem alto potencial poluidor no meio ambiente em que é realizada. Toda a mineração modifica o terreno no processo de extração mineral devido à deposição de rejeitos. O bem mineral extraído não retorna mais ao local de onde foi retirado, ficando em circulação causando diversos males para o meio ambiente e os seres que o habitam (KOPEZINSKI, 2000).

A inalação de poeiras minerais provoca significativas alterações orgânicas, principalmente, as de ordem respiratória. Essas promovem um estado de morbidez, invalidez precoce, diminuição da expectativa de vida e conseqüente mortalidade. Contudo, a quantidade, o tamanho da partícula, o tipo de mineral presente, tempo e a forma de exposição influenciam a severidade e progressão dessas doenças respiratórias, desde a formação de pequenos agregados de macrófagos repletos de carvão disseminado pelo parênquima pulmonar até o desenvolvimento de fibrose nodular ou difusa pulmonar irreversível (PINHO et al., 2005). Apesar de essas alterações terem sido observadas em humanos (ÁVILA, 2009; WANG et al., 2015; XING et al., 2006; LONG et al., 2015) e em modelos experimentais em ratos e camundongos (DRISCOLL et al., 1995, PINHO et al., 2004, 2005), a presença destas em outros animais a partir de modelos experimentais ou por exposição espontânea não são apresentadas na literatura.

A produção e presença de ERO nos tecidos respiratórios, a partir da exposição ao carvão mineral, têm sido observadas em diversos estudos (DRISCOLL et al., 1995, PINHO et al., 2004, 2005, XING et al., 2006, ÁVILA, 2009, WANG et al., 2015, LONG et al., 2015) e os autores têm sugerido que o aumento excessivo na produção de ERO é a principal causa dos danos celulares e dois mecanismos envolvidos nesse processo têm sido propostos: i) o mecanismo intrínseco, ligado às propriedades das partículas de carvão e aos seus componentes; ii) o estresse oxidativo gerado pela excessiva ativação de células fagocitárias, como os macrófagos e os neutrófilos, na tentativa de eliminar estas partículas (NADIF et al.,

2001). Os principais efeitos da geração de ERO incluem dano às membranas celulares, por processos de lipoperoxidação, oxidação de proteínas, interação com os radicais e grupamentos sulfidril, além de dano ao DNA, por oxidação das bases nitrogenadas e riboses, que por sua vez, geram quebras de cadeias de DNA nas células-alvo (JANSSEN et al., 1993).

No presente estudo animais da espécie *Sturnira lilium* coletados em área de mineração de carvão tiveram um aumento ERO a partir da análise do DFC, enquanto que animais da espécie *Artibeus lituratus* não apresentaram o mesmo perfil. De acordo com Gasparotto et al. (2013) e colaboradores, partículas de carvão são capazes de induzir dano celular mediante ativação de mediadores inflamatórios, os quais são responsáveis pelo aumento expressivo de ERO. O fato de somente a espécie *Sturnira lilium* apresentar essa alteração em relação ao seu controle não está claramente definido. Adicionalmente, os animais da espécie *Artibeus lituratus* de área de mineração de carvão tiveram uma diminuição significativa da produção de óxido nítrico quando comparada com os animais do grupo controle. O NO, além de um potente radical livre gerador de espécies reativas de nitrogênio, é também um importante sinalizador intracelular e extracelular e promove uma vasodilatação e broncodilatação na musculatura lisa em diversos tecidos. Níveis baixos de NO observados nos animais pode ser uma resposta induzida pela exposição a poluentes atmosféricos presentes em áreas mineradas. De acordo com Blackford e colaboradores (1997) elementos fibrinogênicos como a sílica, dióxido de carbono e de titânio aumentam os níveis de mRNA de iNOS enquanto que o carvão apresenta diminuição da expressão desta enzima promotora de NO.

Em geral, o que tange a atividade das enzimas antioxidantes no sistema respiratório, há o aumento da atividade da SOD em organismos que habitam ambientes poluídos, uma vez que essa enzima representa a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (ATLI e CANLI, 2007), no entanto, no presente estudo, a atividade da SOD em pulmão de morcegos de área minerada não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. É possível que essa resposta inalterada na atividade da SOD possa estar associada ao desvio do superóxido para se ligar ao óxido nítrico, formando peroxinitrito com consequente dano oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007) o que corrobora os dados de DCF observados na espécie *Sturnira lilium*. Essa possível mudança na rota do superóxido promove alterações nas vias de degradação dos subprodutos gerados pela ação da superóxido dismutase e na redução das enzimas a eles associados, como a catalase. Nesse sentido e como esperado, a atividade da catalase no grupo da área minerada da espécie *Artibeus lituratus*, apresentou uma diminuição significativa em relação ao grupo controle da mesma espécie. Entretanto, a espécie *Sturnira lilium* não demonstrou diferenças significativas em nenhuma destas duas

enzimas antioxidantes. A diminuição da atividade da Catalase em ambientes altamente poluídos também foi relatado por Kono e Fridovich (1982) em Cyprinidae (peixes) que vivem no Seyhan Dam Lake na Turquia. Em estudo com anfíbios em área com mineração de carvão, Zocche et al. (2013) também obteve resultados semelhantes. Estes dados de forma conjunta demonstram que a resposta antioxidante pode ser distinta para cada espécie avaliada neste estudo, bem como podem sugerir que áreas expostas a mineração de carvão exerce efeito negativo sobre este sistema de defesa.

Na análise do conteúdo de GSH, morcegos de área minerada da espécie *Artibeus lituratus* tiveram redução significativa no conteúdo de GSH, quando comparados com morcegos da área controle da mesma espécie. A GSH é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos e portanto, baixos níveis podem comprometer todo sistema de defesa e reparo antioxidante. Não foram encontrados na literatura dados sobre os níveis de glutathione em quirópteros, mas, estudo em humanos (EVELO et al., 1993, ÁVILA, 2009, POSSAMAI et al., 2010), sugerem que a diminuição de GSH induzida pela exposição ao carvão mineral é causada pela liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio por macrófagos alveolares e neutrófilos em tecido pulmonar. Adicionalmente, os resultados também mostraram uma redução significativa no conteúdo total de tiois em morcegos de área minerada da espécie *Artibeus lituratus*, quando comparados ao grupo controle da mesma espécie. Esses dados sugerem uma maior oxidação de grupos tiois, possivelmente há maior produção de RL em detrimento a capacidade antioxidante reduzida pelos animais analisados. Em estudos em ratos (PINHO et al., 2005 e FREITAS 2008) e em culturas de célula pulmonares (GASPAROTTO et al., 2013) resultados similares ao encontrados em nosso estudos também foram observados.

Assim, tomados em conjunto, os resultados desse estudo sugerem que as consequências da exposição crônica por morcegos ao ambiente enriquecido por partículas de carvão mineral promovem consequentes danos oxidativos e, portanto, esses animais podem exercer papel de biomonitoradores do potencial ecológico para populações humanas que habitam nessas áreas expostas ao carvão. Estudos adicionais são necessários para que possamos aferir com maior propriedade os agravos gerados no sistema respiratório e demais sistemas orgânicos de quirópteros e, assim, utilizar esses animais como sentinelas aos efeitos nocivos ao pulmão induzidos pela exposição ao carvão mineral.

6 CONCLUSÃO

Embora este estudo seja preliminar, os seus resultados sugerem que morcegos frugívoros, principalmente *Artibeus lituratus*, que vivem na Bacia Carbonífera Catarinense podem ser utilizados como biomonitores por dividirem o mesmo espaço que o homem e apresentarem resultados semelhantes quanto ao estresse oxidativo.

Estudos adicionais com um maior número de indivíduos, ou com outras espécies de morcegos devem ser realizados a fim de verificar os resultados obtidos neste trabalho preliminar, e para testar novas hipóteses que têm sido formuladas.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v.105, p. 121-126, 1984.

AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.302, p.141-145, 2001.

ANEEL. Agência Nacional de Energia Elétrica. **Carvão Mineral**. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/08-carvao%282%29.pdf>>. Acesso em: junho de 2015.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 145, p. 282-287, 2007.

ÁVILA, S. J. **Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos expostos direta e indiretamente à atividade de mineração do carvão, antes e após suplementação com vitaminas "C" e "E"**. 2009. 109f. Tese (Doutorado em Fármaco Medicamento e Análises Clínicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for SOD. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 32, p. 279-312, 1987.

BLACKFORD, J.A. JR; JONES, W. DEY, R.D.; CASTRANOVA, V. Comparison of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 51, p. 203-218, 1997.

BRADFORD, M.M; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio ambiente. **Resolução do CONAMA n°1/86 Definição de Impacto Ambiental**. Diário Oficial da União, 23 de janeiro de 1986.

CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, J. A.; SOUZA, L. S. Avaliação de três áreas de solo construídos após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Muller, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, n.6, p. 1123-1137, Nov./Dez.2003.

CELLULAR TOXICITY OF NANOPARTICLES. **Cytotoxicity measurements**. Disponível em: <<https://seallab.wordpress.com/research/7-cytotoxicity-measurements/>>. Acesso em junho de 2015.

CLARK, D. R., Jr.; LAVAL, R. K.; TUTTLE, M. D. Estimating pesticide burdens of bats from guano analyses. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Costa Rica, n.29, p. 214-220,1982.

CARVALHO, F. **Assembléia de morcegos (mammalia: chiroptera) da rppn reserva natural salto morato, paraná, brasil: riqueza, diversidade, abundância, estrutura vertical e os fatores que influenciam a ocorrência das espécies nos diferentes estratos.** 2012. 1 mapa.

CPRM. Perspectivas do Meio Ambiente do Brasil – Uso do Subsolo. MME - Ministério de Minas e Energia, 2002. Disponível em: <www.cprm.gov.br>. Acesso em Junho de 2015.

DRISCOLL, K.E.; HASSENBEIN, D.G.; CARTER, J.M.; KUNKEL, S.L.; QUINLAN, T.R.; MOSSMAN, B.T. TNF alpha and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure. **Toxicology Letters.** v. 82, p. 483-489, 1995.

EVELO, C.T.; BOS, R.P.; BORM, P.J. Decrease glutathione content and glutathione S-transferase activity in red blood cells of coal miners with early stages of pneumoconiosis. **British Journal of Industrial Medicine.** v. 50, p. 633-636, 1993.

FALFUSHINSKA, H.; LOUMBOURDIS, N.; ROMANCHUK, L.; STOLYAR, O. Validation of oxidative stress responses in two populations of frogs from Western Ukraine. **Chemosphere,** v.73, n.7, p. 1096-1101, Out/2008.

FARIAS, C.; GOMES, E. **Mineração e meio ambiente no Brasil:** relatório preparado para o CGEE. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <<http://www.cgee.org.br>>. Acesso em: 05 de junho de 2015.

FOLCHINI, F.; JARDIM, J.R.; NASCIMENTO, O.A. Estresse Oxidativo e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. In: GOMES, M.; FARESIN, S.M. (Org.). **PNEUMOLOGIA:** atualização e reciclagem. 7ed. São Paulo: Roca, p. 55-62, 2007.

FREITAS, T.P.; SILVEIRA, P.C.; ROCHA, L.G.; REZIN, G.T.; ROCHA, J.; CITADINI-ZANETTE, V.; ROMÃO, P.T.; DAL-PIZZOL, F.; PINHO, R.A.; ANDRADE, V.M.; STRECK, E.L. Effects of Mikania glomerata Spreng. and Mikania laevigata Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. **Journal of Medicinal Food.** v.11, p. 761-766, 2008.

GASPAROTTO, J.; SOMENSI, N.; CAREGNATO, F.F.; RABELO, T.K.; DABOIT, K.; OLIVEIRA, M.L.; MOREIRA, J.C.; GELAIN, D.P. Coal and tire burning mixtures containing ultrafine and nanoparticulate materials induce oxidative stress and inflammatory activation in macrophages. **Science of the Total Environment.** v. 463-464, p. 743-753.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry.** v. 126, p. 131-138, 1982.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L.D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARÃO, M.F.; MORO, A.M.; NASCIMENTO, P.C.; POMBLUM, V.J.; GARCIA, S.C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v.43, p.619-624, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radical in Biology Medicine. Oxford - NY: University Press, 2007.

HISSIN, P.J.; HILF R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochemistry**. v. 74 (1), p. 214-226, 1976.

JANSSEN, Y. M.; MARSH, W.; ABSHER J. P. et al. Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. **The Journal of Biological Chemistry**. v.267, 10625-10630, 1993.

JONES, G; JACOBS, D.S.;KUNTZ, T.H.; WILLIG,M.R.; RACEY, P.A. Carpe Noctem: the importance of bats as bioindicators. **Endangered Species Research**, v.8, p. 93 – 115, 2009.

JUSTIÇA FEDERAL: **Segundo relatório de monitoramento dos indicadores ambientais**acp nº 2000.72.04.002543-9/sc.Disponível em:
<https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/rel_2_2008_ind_amb_plano_monit.htm>. Acesso em junho de 2015.

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

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits Catalase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 257, p. 5751-5754, 1982.

KOPEZINSKI, I. **Mineração X meio ambiente: considerações legais, principais impactos ambientais e seus processos modificadores**. Porto Alegre: Editora da Universidade. 103p. 2000.

LEBEL, C.P.; ALI, S.F.; MCKEE, M.; BONDY, S.C. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage.**Toxicology and Applied Pharmacology**, v.104, p.17-24, 1990.

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.

LI, N.; XIA, T.; NEL, A. E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. **Free Radical Biology & Medicine**,v. 44, p. 1689-1699, 2008.

LONG, J, STANSBURY, R.C.; PETSONK, E.L. Small airways involvement in coal mine dust lung disease. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 36, p. 358-365, 2015.

MINISTÉRIO PÚBLICO FEDERAL.**Informação no 003/2006 acp nº 2000.72.04.002543-9. Meio ambiente. Carvão mineral. Reparação de danos ambientais em áreas mineradas na bacia carbonífera do sul do estado de Santa Catarina**. Disponível em:
<https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/conteudo/levantamento_minas/mineracao_acp.htm>. Acesso em Junho de 2015.

MOSSMAN, B.T. Introduction to serial reviews on the role of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) in lung injury and diseases. **Free Radicals Biology & Medicine**, v.34, p. 1115-1116, 2003.

NADIF, R.; ORYSZCZYN, M. P.; FRADIER-DUSCH, M. et al. Cross sectional and longitudinal study on selenium, glutathione peroxidase, smoking, and occupational exposure in coal miners. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 58, p. 239-245, 2001.

O'SHEA, T.J.; EVERETTE, A.L.; ELLISON, L.E. Cyclodiene insecticide, DDE, DDT, arsenic and mercury contamination of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) foraging at a Colorado Superfund site. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 112-120, 2001.

PINHO, R.A.; BONATTO, F.; ANDRADES, M.; FROTA, M.L. JR; RITTER, C.; KLAMT, F.; DAL-PIZZOL, F.; ULDRICH-KULCZYNSKI, J.M.; MOREIRA, J.C. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. **Environmental Research**. v. 93, p. 290-297, 2004.

PINHO, R.A.; SILVEIRA, P.C.; SILVA, L.A.; STRECK, E.L.; DAL PIZZOL, F. MOREIRA, J.C.F. N-Acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. **Environmental Research**, v.99, p. 355-360, 2005.

POSSAMAI, F.P.; JUNIOR, S.A.; PARISOTTO, E.B.; MORATELLI, A.M.; INÁCIO, D.B.; GARLET, T.R.; DAL-PIZZOL, F.; FILHO, D.W. Antioxidant intervention compensates oxidative stress in blood of subjects exposed to emissions from a coal electric-power plant in South Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 30, p. 175-180, 2010.

RAHMAN, I.; MULIER, B.; GILMOUR, P.S.; WATCHORN, T.; DONALDSON, K.; JEFFERY, P.K.; MACNEE, W. Oxidant-mediated lung epithelial cell tolerance: the role of intracellular glutathione and nuclear factor-kappaB. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 787-794, 2001.

SANCHEZ, J. C. D.; FORMOSO, M. L. L. Utilização do carvão e meio ambiente. Porto Alegre: **CIENTEC**, p. 34, 1990.

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

SILVA, J.P.S. Impactos ambientais causados por mineração. **Revista Espaço da Sophia**, v. 8, 2007.

SCHINS, R.P; BORM, P.J. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. **The Annals of occupational hygiene**, v.43, n.1, p. 7-33, Jan/1999.

SOARES, E.R.; MELLO, J.W.V. Marcha de oxidação da pirita proveniente de área de mineração de carvão. In: III SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 1997, Ouro Preto. **Anais....** Viçosa: SOBRADE; UFV/ DPS/ DEF, 1997, 245 -248 p.

STANIC, B.; ANDRIC, N.; ZORIC, S.; GRUBOR-LAISIC, G. KOVACEVIC, R. Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlec (*Acipenser ruthenus* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.65, p. 395-402, 2006.

SUN, J.;ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v.3, p. 276 -284, 2003.

TAO, F.; GONZALEZ-FLECHA, B.; KOBZIK, L. Reactive oxygen species in pulmonary Inflammation by ambient particulates, **Free Radical Biology & Medicine**,v.35, p.327–340, 2003.

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

XING, J.C.; CHEN, W.H.; HAN, W.H.; GUO, M.F.; REHN, S.; BRUCH, J. Changes of tumor necrosis factor, surfactant protein A, and phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid in the development and progression of coal workers' pneumoconiosis. **Biomedical and Environmental Sciences**. v. 19, p. 124-129, 2006.

WANG, M.; JIN, Y.; CHEN, S.; YAO, S.; ZHU, L.; DUAN, J.; YUAN, J. The study of autophagy in alveolar macrophages of patients with coal workers' pneumoconiosis. v. 33, p. 41-44, 2015.

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, p.117-124. 2005.

ZOCHE, J.J.; LEFFA, D.D.; DAMIANI, A.P.; CARVALHO, F.; MENDONÇA, R.A.; SANTOS, C.E.L.; BOUFLEUR, L. A.; DIAS, J.F.; ANDRADE, V.M. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. **Environmental Research**, v.110, p. 684-691, 2010.

ZOCHE, J.J.; DA SILVA,L.A.; DAMIANI, A.P.; MENDONÇA, R.A.; PERES,P.B.; DOS SANTOS, C.E.; DEBASTIANI, R.; DIAS, J.F.; DE ANDRADE, V.M.; PINHO, R.A. Heavy-metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*: the impact of coal-mining pollutants on amphibians. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 66, p. 69-77, 2013.

ANEXOS