

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MIRIAM DA CONCEIÇÃO MARTINS**

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM HORTALIÇAS CULTIVADAS  
EM ÁREAS DE EXPLORAÇÃO DE CARVÃO: POTENCIAL  
MUTAGÊNICO E RISCOS À SAÚDE HUMANA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

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

**CRICIÚMA  
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M386a Martins, Miriam da Conceição.

Avaliação genotóxica em hortaliças cultivadas em áreas de exploração de carvão : potencial mutagênico e riscos à saúde humana / Miriam da Conceição Martins ; orientador : Vanessa Moraes de Andrade – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.  
119 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2014.

1. Hortaliças – Toxicologia. 2. Genotoxicidade. 3. Solos – Teor de metal pesado. 4. Avaliação de riscos à saúde humana. 5. Áreas degradadas pela mineração de carvão. I. Título.

CDD 22. ed. 363.7396

## **FOLHA INFORMATIVA**

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações dos Laboratórios de Biologia Celular e Molecular e de Fisiopatologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, bem como no Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Dedico este trabalho ao meu amigo  
Prof. Dr. Paulo Rômulo de Oliveira  
Frota, grande incentivador, que  
muito torceu por mim e que não se  
encontra mais neste plano.



## AGRADECIMENTOS

Esta tese não seria possível sem a colaboração de várias pessoas. Em especial, gostaria de agradecer:

Aos meus pais Florentino e Emília (in memoriam) e ao meu irmão Elias, que mesmo enfrentando os desafios que foram surgindo sempre me apoiaram. Sou grata pela oportunidade de poder fazer parte dessa família.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Vanessa Moraes de Andrade, por todo o conhecimento científico, confiança e amizade demonstrados durante esse período significativo para a minha vida. Você é responsável pela concretização de um sonho que me acompanha há anos.

Ao Prof. Dr. Jairo José Zocche, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, pelas suas contribuições, durante todo o período da pesquisa.

À Profa. Dra. Patrícia Fernanda Schuck, pela acessibilidade, carinho e ajuda.

Ao Prof. Dr. Johnny Ferraz Dias e à Profa. Dra. Carla Eliete Lochims dos Santos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de ampliar os meus conhecimentos na área da física e por me atenderem no que fosse necessário.

Aos bolsistas, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Daniela, Adriani, Karina, Maielen, Victor, Caroline, Gabriela, Francine, Renato, Ana Luiza, Luiza, Maiara, Valeska, Lara, Bruna, Tamires, Giulia, Emanuel, Márcio, Marina e Natália, pela ajuda ofertada durante a realização deste trabalho e convivência.

Aos bolsistas do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Abigail, Maíris e Adriéli, por todo o trabalho que desempenharam.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Paula Rohr, pela contribuição tão necessária para que pudéssemos concretizar os resultados.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Gislaïne Tezza Rezin, pessoa muito especial que tive a oportunidade de conhecer e que contribuiu muito aprendizado.

A todos os Professores Doutores do PPGCS, pelo conhecer amizade.

A Secretaria da Educação do Estado de Santa que me oportunizou a bolsa de estudos FUMDES, providencial no orçamento deste curso.

Aos Professores Doutores avaliadores Ricardo Aurino de Pinho (obrigada pelas preciosas colaborações enquanto revisor deste estudo),



Alessandra Peres, Gabriela Trevisan dos Santos, e Patrícia de Aguiar Amaral pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por oportunizar a aquisição deste título.

A Deus, por tudo.



*“A mente que se abre a uma nova  
ideia jamais voltará ao seu  
tamanho original”.*  
*Albert Einstein*



## RESUMO

No Brasil, a exploração e o processamento do carvão estão concentrados nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A lavra mecanizada do carvão teve início por volta de 1940 e desde então tem provocado alterações físicas, químicas e biológicas nos ecossistemas. A utilização destas áreas como pastagens e para o cultivo de alimentos, inclusive hortas domésticas, deve ser feita com cautela, pois os efeitos deletérios à saúde humana, causados pela presença de elementos tóxicos no substrato, e sua conseqüente biomagnificação ainda não foram devidamente avaliados. Muitos elementos presentes no rejeito do carvão são ricos em metais potencialmente tóxicos e genotóxicos, o que acaba por levar a mudanças profundas nas células, tecidos, populações e ecossistemas. O estudo objetivou avaliar os danos a biomoléculas de camundongos submetidos à ingestão de hortaliças cultivadas em horta experimental, construída numa área de mineração, analisando de forma indireta os riscos à saúde humana. A pesquisa contemplou as seguintes hortaliças: *Lactuca sativa* - alface, *Beta vulgaris* - beterraba, *Brassica oleracea L. var. Italica Plenck* - brócolis e *Brassica oleracea L. var. Acephala D.C.*- couve. Utilizou-se para este estudo camundongos Swiss adultos machos, e a exposição dos animais às hortaliças aconteceu por meio de gavagem do suco das folhas. Os animais foram divididos em 15 grupos com dois tratamentos diferentes: Tratamento agudo (09 grupos): uma única administração dos sucos das hortaliças e controle com coletas de sangue em 3h, 6h e 24h. Tratamento crônico (06 grupos): administração contínua por 30 dias dos sucos das hortaliças, e controle com coleta de sangue em 2, 5, 10 e 30 dias. Nos dois tratamentos foram analisados elementos químicos no fígado utilizando Pixe, e também foi coletado células sanguíneas, córtex, fígado e medula óssea para análise de Dano em DNA. Os resultados da análise do solo mostraram níveis significativamente superiores de Mg, P, S, Ca e Zn no solo oriundo da área de mineração quando comparado ao solo orgânico. Nas folhas das hortaliças (alface, beterraba, brócolis e couve) obtivemos níveis significativamente diferentes de Mg, Si, P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn, entre o solo orgânico e o oriundo da área minerada. O fígado dos animais expostos ao tratamento



agudo apresentou níveis de Mg, Si, S e Ca, aumentado no grupo que ingeriu o suco de hortaliças proveniente do solo da mina. Na exposição crônica ao suco de alface e couve foram encontrados níveis de Si, P, K, Fe, Cu e Zn aumentados no fígado dos animais que ingeriram suco de hortaliças oriundas do solo da mina quando comparado ao grupo orgânico. O tratamento agudo e crônico de camundongos com suco de hortaliças cultivadas em área da mineração resultou em danos no DNA, nas células sanguíneas, córtex e fígado. Através dos nossos resultados podemos concluir que o consumo de hortaliças cultivadas sobre área de minerada apresenta potencial genotóxico, podendo gerar um risco considerável à saúde humana.

**Palavras-chave:** hortaliças; ensaio cometa; teste de micronúcleos; análise elementar.



## ABSTRACT

In Brazil, coalmine exploration is concentrated in the southern states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul. Mechanization of coal mining began around 1940, and since then, it has caused physical, chemical and biological changes in ecosystems. The use of these areas for grazing and for growing food, including home gardens should be made with caution, because the deleterious effects on human health caused by the presence of toxic elements in the substrate and its consequent biomagnification have not been properly assessed. Many elements present in coal byproducts as well as coal tailings are rich in potentially toxic and genotoxic metals, which ultimately lead to profound changes in cells, tissues, populations, and ecosystems. The aim of this study was to assess the damage to biomolecules of mice subjected to eating vegetables cultivated in an experimental garden located in a coal-mining recovery area, which will allow for an indirect analysis of the risks to human health. The research included the following vegetables: *Lactuca sativa* (lettuce), *Beta vulgaris* (beetroot), *Brassica oleracea L. var. Italica Plenck* (broccoli), and *Brassica oleracea L. var. Acephala D.C.* (cabbage). Adult male Swiss mice were used for this study. The mice were administered with concentrated juice of the vegetable leaves by gavage. The animals were divided into 15 groups and subjected to two different treatments: Acute treatment (9 groups): a single-dose administration of vegetable juice and control with blood collections at 3h, 6h and 24h. Long-term treatment (6 groups): continuous administration of vegetable juice for 30 days, and control with blood collections after 2, 5, 10, and 30 days. Mice submitted to the different treatments had their liver analyzed using Pixe, cortex, liver, and bone marrow for DNA damage analysis. The results of soil analysis showed significantly higher levels of Mg, P, S, Ca, and Zn derived from the coal-mining recovery area when compared to organic soil. Analysis of the vegetable leaves (lettuce, beetroot, broccoli and cabbage) revealed that the levels of Mg, Si, P, S, K, Ca, Fe, Cu and Zn, were significantly higher in the mining area than in the organic soil. The liver of animals exposed to acute treatment showed increased levels of Mg, Si, S and Ca, in the group that ingested the vegetable juice from the mining area than their counterparts.



The liver of animals with long-term exposure to lettuce and cabbage juice from the mining area showed increased levels of Si, P, K, Fe, Cu, and Zn when compared to those fed with vegetables grown in organic soil. Increased levels of thiobarbituric acid were observed in the liver of mice that had a long-term administration juice of lettuce and cabbage grown in organic soil. Acute and long-term administration of vegetable juice cultivated in the mining area resulted in DNA damage in blood cells, cortex and liver of the animals. The results of our study allowed us to conclude that the consumption of vegetables grown in mining areas has a genotoxic potential, which can generate a considerable risk to human health.

**Keywords:** vegetables; comet assay; micronucleus test; element analysis.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Corpos cônicos de rejeitos em Santa Catarina.....	34
Figura 2 - Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese por metais .....	40
Figura 3 - Loteamento em expansão em área impactada pelo carvão ...	41
Figura 4 - Culturas tradicionais sobre a área de rejeito piritoso .....	42
Figura 5 - (A) localização da horta experimental na área de exploração de carvão. ....	53
Figura 6 - Hortaliças utilizadas no estudo. ....	54
Figura 7 - Avaliação do reparo de DNA em células sanguíneas de camundongos expostos ao tratamento crônico com suco de couve cultivada em área de rejeito de exploração do carvão. ....	74



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição elementar em Solo de Área de Exploração de Carvão e Orgânico através da análise de PIXE (mg g <sup>-1</sup> dw). .....	61
Tabela 2 - Composição elementar em Hortaliças cultivadas em Área de Exploração de Carvão e Orgânica através da análise de PIXE (mg g <sup>-1</sup> dw). .....	63
Tabela 3 - Composição elementar em Fígado de camundongos expostos de forma aguda aos sucos de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e Orgânica através da análise de PIXE (mg g <sup>-1</sup> dw). .....	66
Tabela 4 - A Composição elementar em fígado de camundongos expostos de forma crônica aos sucos de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e Orgânica através da análise de PIXE (mg g <sup>-1</sup> dw). .....	68
Tabela 5 - Detecção de danos em DNA de sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma aguda aos sucos de folhas de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e solo Orgânico através do Ensaio Cometa.....	70
Tabela 6 - Detecção de danos em DNA em sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma crônica aos sucos de folhas de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão, de maneira Orgânica e controle negativo usando o Ensaio Cometa. ....	73
Tabela 7 - Avaliação da mutagenicidade em camundongos expostos ao tratamento agudo com sucos de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e de maneira Orgânica, bem como ao controle negativo, usando o Teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos.....	76
Tabela 8 - Avaliação da mutagenicidade em camundongos expostos ao tratamento crônico com sucos de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e de maneira Orgânica, bem como ao controle negativo, usando o Teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos.....	77



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG- 8-hidroxi-2'- deoxiguanosina do inglês, 8-*Oxo-2'-deoxyguanosine*  
AC - Aberrações cromossômicas  
Al - Alumínio  
ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica  
BHE - Barreira Hematoencefálica  
Br - Bromo  
Ca - Cálcio  
CETEM - Centro de Tecnologia Mineral  
Cl - Cloro  
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente  
CP - Ciclofosfamida  
Cr - Cromo  
CSN - Companhia Siderúrgica Nacional  
Cu - Cobre  
DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*  
DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral  
DSB - Quebras de Fita Duplas, do inglês *Double Strand Break*  
ENC - Eritrócitos normocromáticos  
ENCMn - Eritrócitos normocromáticos micronucleados  
EPC - Eritrócitos policromáticos  
EPCMn - Eritrócitos policromáticos micronucleados  
ERO - Espécies reativas de oxigênio  
Fe - Ferro  
FD - Frequência de danos  
Fhit - Frágil histidina gene tríade, do inglês *Fragile Histidine Triad*  
ID - Índice de danos  
K - Potássio  
Mg - Magnésio  
MMS - Metil metano sulfonato  
Mn - Manganês  
MN - Micronúcleos  
Na - Sódio  
Ni - Níquel  
NPK - Nitrogênio fósforo potássio  
O<sub>2</sub> - Oxigênio  
P - Fósforo



P16 - Proteína supressora de tumor, do inglês *Tumor Suppressor Protein*  
P53 - Gene supressor tumoral, do inglês *Tumor Suppressor Gene*  
Pb - Chumbo  
PIXE- Emissão de raios-X induzida por partículas, do inglês *Proton-induced X- ray emission*  
Rb - Rubídio  
RBS - Espectroscopia de retrodispersão de rutherford, do inglês *Rutherford backscattering spectroscopy*  
ROM - do inglês *Run off Mine*  
S - Enxofre  
Se - Selênio  
Si - Silício  
SO<sub>x</sub>. Óxido de enxofre  
Sr - Estrôncio  
TCI - Troca de cromatídes irmãs  
Ti - Titânio  
Zn - Zinco



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
1.1 CARVÃO .....	31
1.2 DEGRADAÇÃO AMBIENTAL .....	33
1.3 DANOS GENOTÓXICOS ASSOCIADOS AO USO DO CARVÃO .....	35
1.4 METAIS PESADOS X DANO EM DNA .....	37
1.5 HORTALIÇAS EM ÁREAS DEGRADADAS .....	40
<b>1.5.1 <i>Lactuca sativa L.</i> (alface)</b> .....	<b>44</b>
<b>1.5.2 <i>Beta vulgaris L.</i> (beterraba)</b> .....	<b>45</b>
<b>1.5.3 <i>Brassica oleracea L.</i> (brócolis)</b> .....	<b>46</b>
<b>1.5.4 <i>Brassica oleracea L. var. acephala D.C.</i> (couve)</b> .....	<b>47</b>
1.6 JUSTIFICATIVA .....	48
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
3.1 ANIMAIS .....	52
3.2 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	52
3.3 HORTALIÇAS E PREPARO DA AMOSTRA .....	53
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL .....	54
3.5 ANÁLISE ELEMENTAR ATRAVÉS DA EMISSÃO DE RAIOS- X INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE) .....	56
3.6 ENSAIO COMETA .....	57
3.7 TESTE DE MICRONÚCLEOS .....	59
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	59
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
4.1 ANÁLISE ELEMENTAR ATRAVÉS DA EMISSÃO DE RAIOS- X INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE) .....	60
4.2 ENSAIO COMETA AGUDO .....	69
4.3 ENSAIO COMETA CRÔNICO .....	72
4.4 TESTE DE MICRONÚCLEOS .....	75
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>78</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>93</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>117</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CARVÃO

O carvão mineral é o mais abundante dos combustíveis fósseis utilizado mundialmente como fonte de energia elétrica. Suas reservas mundiais compreendem a América do Norte, do Sul e Central, Europa, antiga URSS, África, Oriente Médio e Ásia (ANEEL, 2008). O carvão mineral é um combustível fóssil sólido, formado a partir da matéria orgânica de vegetais depositados em bacias sedimentares.

Por ação de pressão e temperatura em ambiente sem contato com o ar, em decorrência de soterramento e atividade orogênica, os restos vegetais ao longo do tempo geológico solidificam-se, perdem oxigênio e hidrogênio e enriquecem-se em carbono, em um processo denominado carbonificação (Laus et al., 2006).

Os diversos estágios de carbonificação originam progressivamente turfa, linhito, carvão sub-betuminoso, carvão betuminoso e antracito (Press, 2006). O carvão possui uma estrutura química heterogênea altamente complexa de componentes orgânicos, constituídos por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre.

O carvão é uma das maiores fontes naturais de hidrocarbonetos, componentes inorgânicos e partículas discretas de matéria mineral, que formam as cinzas, intimamente misturados apresentando fases sólidas, líquidas e gasosas de origem orogênica e antropogênica (Liu et al., 2005a).

Apesar dos vários impactos ambientais, o carvão é mundialmente utilizado como fonte de energia elétrica por conter as seguintes características: abundância e distribuição geográfica das reservas e baixos custos e estabilidade nos preços, quando comparado a outros combustíveis (ANEEL, 2008).

De acordo com Brack (2003), 90% das reservas mundiais de carvão mineral estão localizadas no hemisfério norte. Porém o Brasil dispõe de uma das maiores reservas de carvão da América Latina, e os depósitos de maior importância econômica que apresentam o carvão sub-betuminoso e betuminoso estão na bacia do Paraná (Formação Rio Bonito, do Permiano Médio), localizada no sul do País, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (Borba, 2001; Soares et al., 2006).

As reservas brasileiras de carvão mineral conhecidas totalizam 32 bilhões de toneladas "*in situ*", ocorrendo predominantemente na região sul do País nos domínios geológicos da Bacia do Paraná, podendo,

contudo, ocorrer pequenas quantidades na região sudeste no estado de São Paulo. Deste total, o estado do Rio Grande do Sul detém 89,25%, Santa Catarina 10,41%, Paraná 0,32% e São Paulo 0,02% (Horbach et al., 1986; DNPM, 2008). Este mineral constitui dois terços dos recursos energéticos não renováveis nacionais, sendo suas reservas 20 vezes maiores do que as do petróleo e 75 vezes superiores às do gás natural (Sanchez e Formoso, 1990).

O carvão assumiu posição de destaque no cenário nacional, em virtude de suas características metalúrgicas, após a instalação da Companhia Siderúrgica Nacional (CSN) no ano de 1945. Em 1980 houve incremento significativo na pesquisa relacionada aos diversos programas de desenvolvimento do Setor Carbonífero (Müller et al., 1987).

Em Santa Catarina, o carvão mineral foi descoberto em 1827, na localidade de Guatá, município de Lauro Müller. Entretanto, a indústria carbonífera apenas se estabeleceu no Brasil a partir das últimas Guerras Mundiais, tendo seu avanço na década de 70 devido à crise do petróleo (Silva et al., 2009). Dessa maneira, diversas cidades brasileiras se desenvolveram no sul do Brasil, como Candiota, Hulha Negra, Minas do Leão, Butiá e Arroio dos Ratos, no Rio Grande do Sul, e Criciúma, Lauro Müller e Siderópolis, em Santa Catarina (Monteiro, 2004).

Nestes estados o carvão fóssil distribui-se em oito grandes jazidas, sete das quais no Rio Grande do Sul e uma em Santa Catarina, além de várias outras de menor porte (Gomes et al., 1998). As jazidas catarinenses estão localizadas nos seguintes municípios: Orleans, Lauro Müller, Urussanga, Siderópolis, Criciúma, Içara, Nova Veneza, Maracajá, Araranguá, Forquilha e Treviso, municípios estes inseridos na bacia carbonífera catarinense (Milioli et al., 2009).

A Bacia Carbonífera Catarinense encontra-se no sudeste do estado de Santa Catarina, abrange uma área de 1850 km<sup>2</sup>, ocupando uma faixa de 95 km de comprimento por 20 km de largura entre os paralelos 28°48'25" e 28°23'54" e meridianos 49°33'38" e 49°15'11" (Horbach et al., 1986; DNPM, 2008). Os primeiros trabalhos de exploração de carvão no estado catarinense ocorreram na região de Lauro Müller, no ano de 1861, quando o Visconde de Barbacena recebeu do Imperador D. Pedro II a concessão para explorar o carvão mineral. Até 1884 predominavam as pequenas produções, com extração totalmente manual (CETEM, 2001).

O Carvão Catarinense se destaca por ser o único encontrado na região Sul do Brasil que é coqueificável (pode ser usado para produção de aço), além de servir como fonte de energia para usinas termoeletricas.

O carvão encontrado nos outros estados presta-se somente para a produção de termoelectricidade (Martins, 2005).

Este minério encontra-se depositado em jazimentos superficiais (afiorante – 40 metros) e profundos (além de 50 metros). Esta classificação é dada em função do custo-benefício econômico de sua exploração que determina a forma de mineração a céu aberto ou subterrânea. Embora distintas no modo de extração do minério, cada forma emprega uma série de técnicas que têm gerado vários impactos ambientais (DNPM, 2004).

## 1.2 DEGRADAÇÃO AMBIENTAL

No sul do estado de Santa Catarina a lavra mecanizada do carvão tem provocado alterações físicas, químicas e biológicas nos ecossistemas, comprometendo de forma direta os recursos hídricos, o solo e a biota (Costa et al., 2007; Freitas et al., 2007; Zocche-De Souza et al., 2007; Costa e Zocche, 2009; Zocche et al., 2010a; Zocche et al., 2010b) numa extensão que varia de 2000 a 6000 ha (Alexandre, 1999; CETEM, 2001).

Embora a mineração do carvão seja uma importante atividade econômica e fonte de energia para o País, os impactos ambientais gerados são de grande magnitude. Partindo-se de uma produção bruta média de 720.000 toneladas/mês de *Run off Mine* (ROM) na Região Carbonífera Catarinense, com uma recuperação média de 36% do carvão bruto após o beneficiamento, tem-se atualmente a geração de aproximadamente 460.800 toneladas/mês de rejeitos sulfetados (tais como a pirita, marcassita, pirolusita e a calcopirita), denotando-se assim o grande impacto ambiental causado mensalmente (DNPM, 2008).

Estes minerais, por possuírem um poder calorífico mais baixo do que o carvão e por produzirem grande quantidade de óxido de enxofre ( $SO_x$ ) na combustão, são classificados como rejeitos e, como tais, devem ser descartados sob condições específicas (Da Silveira et al., 2009; Defaveri et al., 2009).

Como se observa, a exploração (atividades de pesquisa, exploração, beneficiamento e comercialização) do carvão gera quantidades significativas de resíduos potencialmente poluidores que causam o assoreamento e a acidificação das drenagens superficiais e a acidificação de águas subterrâneas, alterando a geomorfologia local (Costa e Zocche, 2009).

Um dos principais problemas está relacionado com a disposição destes resíduos, que possuem uma quantidade significativa de

compostos poluidores como piritas e marcassitas, argilas e elementos traço (O’Shea et al., 2001; Sampaio, 2002), para os quais se tem a ocorrência registrada em todo o mundo de mais de trinta elementos entre raros e pesados associados à matriz do carvão (Goldschmidt, 1930).

A disposição inadequada de rejeitos sólidos e das águas efluentes da mineração de carvão na bacia hidrográfica do sul de Santa Catarina acarretou severa degradação ambiental, tendo sido, em 1980, considerada 14ª área crítica nacional no que se refere ao controle da poluição e qualidade ambiental (Carvalho, 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Corpos cônicos de rejeitos em Santa Catarina



Fonte: Belolli ( 2002).

A partir do final da década de 80, com a publicação da Resolução CONAMA 001/86 (BRASIL, 1986), a Legislação Brasileira passou a normatizar o descarte de rejeitos da mineração do carvão, exigindo que tais materiais fossem dispostos em módulos controlados (pilhas de rejeitos). Mesmo o rejeito sendo depositado de modo controlado, o uso futuro de tais áreas ainda é incerto, pois os elementos tóxicos presentes tendem a migrar no perfil do novo “solo construído”, uma vez que a camada de material argiloso depositado sobre os rejeitos é muito tênue, ficando em torno de 0,30 a 0,50 m de espessura. Ao mesmo tempo, o

aumento na espessura dessa camada tende a agravar os problemas ambientais já existentes, pois uma nova área será degradada para servir como área de empréstimo de argila (Costa e Zocche, 2009).

O problema mais diretamente ligado à extração carbonífera e aos consequentes danos foi que muito tarde a população começou a se preocupar com as questões ambientais, sobretudo as relacionadas com a degradação ambiental, promovida pela exploração do carvão e as imensas áreas contaminadas com o rejeito piritoso, onde solo, água e ar são afetados e, por conseguinte, a própria população (Carvalho, 2008).

### 1.3 DANOS GENOTÓXICOS ASSOCIADOS AO USO DO CARVÃO

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

Em estudos realizados com trabalhadores de minas de carvão a céu aberto, bem como aqueles de escavações, verificou-se aumento no índice de aberrações cromossômicas (AC) e troca de cromátides irmãs (TCI) quando comparado com grupos controle (Srám et al., 1985; Agostini et al., 1996; Donbak et al., 2005; Santa Maria et al., 2007).

Léon-Mejia et al. (2011), ao avaliar os efeitos genotóxicos, citogenéticos e a presença de metais em uma população de trabalhadores exposta aos resíduos da mineração de carvão de Guajira-Colômbia, encontrou dano genético em trabalhadores expostos. Rohr et al. (2013), ao avaliar o risco ocupacional em trabalhadores de minas de carvão de Candiota (RS), em comparação com os não expostos, encontrou efeito genotóxico e mutagênico, utilizando o ensaio cometa e o teste de micronúcleo.

Também foi observada indução de aberrações cromossômicas em trabalhadores de usinas termelétricas, que utilizam o carvão como fonte de energia (Srám et al., 1985; Siwinska et al., 2004; Rohr et al., 2013). Adicionalmente, observou-se um aumento de defeitos congênitos em seres humanos nas regiões de mineração de carvão no Rio Grande do Sul (Leite e Schüler-Faccini, 2001).

Além disso Kuzmick et al. (2007) observaram efeitos genotóxicos da combustão de carvão por meio de estudos realizados com a espécie de camarão *Palaemonetes pugio Holthius*, em células humanas (Celik et al., 2007), e bactérias (Nakajima et al., 2008).

Também foram encontrados danos genotóxicos e mutagênicos em roedores como *Rattus rattus* e *Mus musculus*, *Ctenomys torquatus*, que vivem próximos a áreas mineradas (Da Silva et al., 2000a; Da Silva et al., 2000b; Léon et al., 2007).

Para Léon et al. (2007), os mamíferos *Rattus rattus* e *Mus musculus*, *Ctenomys torquatus* expostos a áreas mineradas por carvão apresentaram valores significativamente maiores de índice de danos (ID) e frequência de danos (FD), quando comparados aos animais da área controle. Da Silva et al. (2000a) e Da Silva et al. (2000b), através de estudos realizados com o roedor *Ctenomys torquatus*, demonstraram que o carvão e seus subprodutos não apenas induziram danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) de células sanguíneas, bem como produziram efeitos genotóxicos no organismo como um todo.

Zocche et al. (2010b), ao examinar danos no DNA de células sanguíneas de morcegos insetívoros da Bacia Carbonífera catarinense, encontrou no ID e FD, parâmetros avaliados pelo ensaio cometa, diferenças significativas maiores na área de mineração em relação à área de controle, indicando uma contaminação das espécies de morcegos que habitam áreas de mineração.

Zocche et al. (2013), ao avaliar a genotoxicidade em células sanguíneas do anfíbio *Hypsiboas faber* (Wied-Neuwied, 1821) exposto à área minerada de carvão do sul de Santa Catarina, mostraram que animais expostos à área minerada apresentaram um nível significativamente maior de danos no DNA quando comparado aos animais que viviam na área sem contaminação.

Leffa et al. (2010) observou efeitos genotóxicos no molusco *Helix aspersa* (Müller, 1774) exposto ao rejeito carbonífero, através da via dérmica e também alimentar, com a ingestão da hortaliça *Lactuca sativa* L. cultivada em área minerada. Adicionalmente Leffa et al. (2010) analisou a genotoxicidade do rejeito de carvão em moluscos expostos a este material e com aqueles que não foram expostos (controle; animais alimentados com alface de solo orgânico). Na comparação desses dois grupos de moluscos, em ambos os parâmetros do ensaio cometa (ID e FD), em todas as horas de exposição ao rejeito apresentaram um maior nível de danos no DNA do que aqueles do grupo controle, demonstrando um potencial genotóxico do rejeito do carvão.

Menezes et al. (2013) avaliou o potencial genotóxico do extrato aquoso da planta nativa, *Baccharis trimera* (carqueja), exposta às emissões de carvão de uma usina termoelétrica em Candiota (RS). Os resultados mostraram que o extrato de *Baccharis trimera* (carqueja),

coletadas na região exposta ao carvão se apresentou genotóxico em comparação ao controle, pois houve um aumento significativo de danos no DNA.

Assim como os estudos citados acima, muitos outros vem demonstrando o efeito danoso do carvão e seus derivados, nos mais diversos organismos, uma vez que está relacionado com componentes capazes de acarretar lesões na molécula de DNA.

#### 1.4 METAIS PESADOS X DANO EM DNA

Os metais pesados podem ser encontrados em todos os compartimentos do ecossistema, nunca se esgotam e sempre existiram no planeta. São oriundos de fontes naturais e/ou antrópicas como intemperismo de rochas, deposição atmosférica, lançamentos de efluentes urbanos, industriais e agrícolas, além da lixiviação de resíduos contaminados, sendo a mineração e a purificação de minérios um dos grandes causadores da sua disseminação mundial (Pascalichio, 2002).

Existem efeitos adversos nos sistemas biológicos, tais como a genotoxicidade e a carcinogenicidade, que têm sido atribuídos a metais pesados presentes no carvão e também nos seus subprodutos (Miadokova et al., 1999; Da Silva et al., 2000a; Da Silva et al., 2000b; Paraíba et al., 2006). A partir disso, torna-se de suma importância caracterizar os metais responsáveis por esses efeitos nocivos, bem como entender e elucidar os mecanismos que são responsáveis pela lesão genômica, a fim de buscar medidas preventivas contra esses efeitos deletérios que acometem todos os seres vivos, incluindo o homem.

Segundo Sánchez-Chardi et al. (2008), minas abandonadas apresentam um grave problema ambiental e de saúde em todo o mundo, devido aos efeitos nocivos aos organismos, destacando-se os metais pesados por apresentarem grande acumulação em tecidos (acima dos níveis tóxicos), além de alterações fisiológicas. Os metais pesados oriundos das atividades de lavra e beneficiamento do carvão na Região Carbonífera Catarinense são principalmente: arsênio (As), bário (Ba), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg), níquel (Ni), prata (Ag), selênio (Se) e zinco (Zn). Para muitas destas substâncias químicas há evidências de mutagenicidade e carcinogenicidade em humanos e/ou animais de laboratório (Agostini et al., 1996).

Hashimoto et al. (2007) explicam que o DNA é continuamente exposto a danos, tanto de forma direta quanto indireta, todavia existem mecanismos de reparo para manter a sua integridade, porém, quando o

sistema de reparo não é eficiente, o dano é cumulativo. Defeitos no sistema de reparo de dano no DNA têm sido associados a muitas patologias, tais como câncer, imunodeficiência e neurodegeneração (Elkhamisy e Caldecott, 2006).

Os metais, que não participam de reações bioquímicas necessárias à manutenção da vida, quando entram no organismo por contaminação exógena são transportados para diversos sítios, interagem biologicamente de várias formas e geram uma extensa lista de efeitos tóxicos (Silva e Fregoneze, 2002).

Esses metais, quando absorvidos através da ingestão, inalação ou penetração subcutânea, acumulam-se principalmente no fígado de mamíferos, podendo também acumular-se nas células endoteliais. Adicionalmente destrói a barreira hematoencefálica (BHE), e cria uma porta de acesso dos metais ao encéfalo, particularmente em crianças e animais jovens, devido imaturidade funcional da BHE (Silva e Fregoneze, 2002).

A toxicidade dos metais está diretamente relacionada com a dose, tempo de exposição, forma química e física do elemento e sua via de administração/absorção (Lopes, 2009). Deste modo os metais pesados podem afetar, praticamente, todos os órgãos e sistemas do organismo humano, incluindo alterações nos sistemas neurológico, hematológico, metabólico e cardiovascular (Silva e Fregoneze, 2002).

Os metais carcinogênicos são frequentemente co-mutagênicos, ou seja, aumentam a mutagenicidade de outros agentes genotóxicos. Muitos compostos metálicos em baixas concentrações têm sido identificados como inibidores de reparo aos danos causados no DNA, quer seja por agentes xenobióticos ou por fatores endógenos (Beyersmann e Hartwig, 2008). A atuação dos metais na inibição do sistema de reparo está relacionada à interferência destes na ação de importantes proteínas com função no sistema de reparo (Giaginis et al., 2006).

No que diz respeito à interferência do controle do crescimento celular, alguns metais cancerígenos demonstraram inativar a proteína supressora de tumor p53 e/ou desregular a expressão de genes supressores tumorais como o Fhit, p16, p53 e genes de senescência. Finalmente, íons metálicos podem desregular a proliferação celular por processos apoptóticos inativadores, resultando em uma adaptação da citotoxicidade do metal (Beyersmann e Hartwig, 2008).

O desenvolvimento tumoral também é caracterizado por uma desregulação do crescimento celular e diferenciação. Compostos metálicos cancerígenos podem alterar o crescimento celular por mecanismos distintos, tanto afetando a expressão de fatores que

estimulam crescimento ou inativando mecanismos de controle do crescimento. Com relação ao primeiro, alguns íons metálicos são destinados a ativar precursores de sinalização mitogênica e induzir a expressão de proto-oncogenes celulares (Beyersmann e Hartwig, 2008).

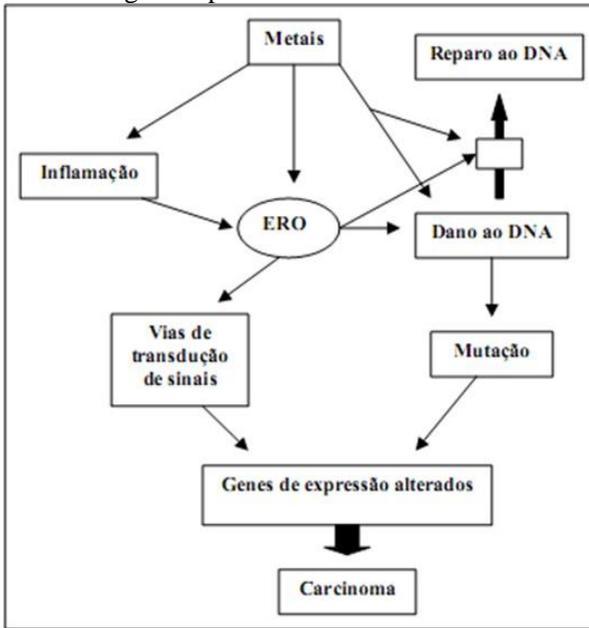
Segundo Laus et al. (2006), metais como ferro, cobre, cádmio, cromo (Cr), níquel, entre outros, possuem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio, e quando essas espécies são formadas intracelularmente, além de danos em biomoléculas elas podem induzir depleção de grupamentos tióis, alterar vias de transdução de sinais e a homeostase do íon cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ).

As ER de oxigênio induzem mutações pontuais e aberrações cromossômicas nas células, produzidas principalmente pela indução de alterações e modificações oxidativas (Cooke et al., 2003; Vincent e Taylor, 2006; León-Mejía et al., 2011; Leffa et al., 2014).

ERO em baixas concentrações são necessárias para a manutenção do estado de oxirredução celular, para a função e sinalização celulares normais, bem como para o funcionamento do sistema imunológico (Sitkovsky e Lukashev, 2005; Hursting e Berger, 2010; Marchetti et al., 2012). Contudo, sob uma condição de estresse oxidativo, a menos que essas ER sejam neutralizadas por mecanismos de proteção celular antioxidante, elas interagem com macromoléculas e podem causar alterações em biomoléculas, causando a fragmentação do DNA, comprometendo as funções celulares normais (Hursting e Berger, 2010; Marchetti et al., 2012).

Segundo a figura 2 abaixo, os metais podem provocar dano ao DNA de forma direta ou indireta pela formação das ERO. A geração das ERO pode ser afetada pelos metais por muitas vias. Por exemplo, através da reação de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{HO}^-$ ), da indução do processo inflamatório, ou através da formação intermediária de tioradicaís ( $\text{RSH} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{RS}\cdot + \text{Cu}^+ + \text{H}^+$ ) (Birben et al., 2012). A maior parte do dano ao DNA é reparada pelo eficiente mecanismo celular de reparo, enquanto que uma pequena parte do dano resulta em mutação.

Figura 2 - Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese por metais



Fonte: Galaris e Evangelou (2002).

Tanto a mutação quanto os fatores de transcrição podem modular a expressão de uma variedade relevante de genes para a transformação celular, conduzindo finalmente ao desenvolvimento do câncer (Laus et al., 2006).

## 1.5 HORTALIÇAS EM ÁREAS DEGRADADAS

Na Bacia Carbonífera Catarinense, de meados da década de 40 até o final dos anos 80 do século passado, o descarte dos rejeitos da mineração e do beneficiamento do carvão foi executado sem cuidados ambientais (Costa e Zocche, 2009; Zocche et al., 2010a). Inicialmente os rejeitos eram depositados nas cercanias das minas de carvão e, à medida que a produção foi aumentando e as frentes de lavra avançando, foram sendo depositados em qualquer local sem a menor preocupação com a degradação da qualidade ambiental (Carvalho, 2008).

Como era um material a ser descartado, as empresas mineradoras o ofereciam à população como material para aterro, sendo depositado

em grande quantidade na periferia urbana e inclusive em áreas baixas e alagáveis. Com a expansão urbana, os loteamentos foram avançando sobre estas áreas, normalmente destinados a abrigar a população de baixa renda (Carvalho, 2008) (Figura 3).

Figura 3 - Loteamento em expansão em área impactada pelo carvão



Fonte: Carvalho (2008)

Para a construção de moradias sobre os depósitos de rejeitos era depositada uma camada tênue de argila, de 0,20 a 0,30 m, a qual foi sendo paulatinamente desgastada pela erosão hídrica. Com a construção de moradias veio o plantio e o consumo de hortaliças, temperos e plantas medicinais, as quais, pelo fato de terem contato direto, por meio de suas raízes, com os materiais tóxicos e mutagênicos, como os metais pesados, que estão presentes nos rejeitos da mineração e beneficiamento do carvão, representam um risco genotóxico potencial à população humana (Costa e Zocche, 2009; Zocche et al., 2010a) (Figura 4).

Figura 4 - Culturas tradicionais sobre a área de rejeito piritoso



Fonte: Carvalho (2008).

Populações humanas que vivem sobre, próximo ou a jusante das áreas mineradas de carvão e não recuperadas no sul de Santa Catarina utilizam plantas medicinais, exploram as pastagens para alimento do gado e para a apicultura, utilizam os recursos hídricos para a produção de arroz e cultivam hortas domésticas. O homem, pelo fato de ocupar os níveis tróficos mais elevados, ao se alimentar de produtos de origem vegetal ou animal oriundos de áreas contaminadas por metais pesados (como é o caso das áreas de mineração de carvão), corre sérios riscos de saúde (Zocche et al., 2010b).

A maioria das espécies vegetais que crescem em solos contaminados por metais pesados não consegue evitar a absorção desses elementos, mas somente limitar sua translocação (Soares et al., 2001). Isso ocorre principalmente porque durante os primeiros estágios da revegetação a comunidade de plantas extrai grandes quantidades de nutrientes do solo. Este processo continua até a construção de uma reserva orgânica, com a qual a absorção de nutrientes pelas plantas passa a depender dos processos de decomposição da cobertura e mineralização dos nutrientes, principalmente o nitrogênio e o fósforo (Gaivizzo et al., 2002a).

O sistema solo-planta é um sistema aberto, em que geralmente o teor e o acúmulo de metais nos tecidos dependem de fatores como o tipo

de metal e sua disponibilidade na solução do solo; o movimento do metal no solo e na superfície das raízes; o transporte destes da rizosfera para a raiz e a translocação para o restante da planta (Aloway, 1990; Gussarsson et al., 1995). Os metais podem ainda induzir alterações na diferenciação do próprio sistema vascular da planta, uma vez que, em concentrações menores, alcançam as folhas, podendo alterar a estrutura e a funcionalidade das células fotossintéticas (Soares et al., 2001).

Várias espécies de plantas são conhecidas como concentradoras ou acumuladoras de metais pesados (Brooks, 1983). Ao serem absorvidos e metabolizados pelas plantas, os elementos químicos se tornam disponíveis aos animais, que os ingerem ao se alimentarem das raízes, cascas, caules, folhas, néctar, pólen, resina, frutos ou sementes (animais herbívoros) e de outros animais (carnívoros de primeira e de segunda ordem) que têm contato com as áreas mineradas (Hendriks et al., 1995; Walker et al., 2002). Muitos desses elementos são considerados essenciais, e, portanto, entram no metabolismo, enquanto outros não têm uma função definida, mas têm alta afinidade com tecidos de reserva (óleos e gorduras), provocando o fenômeno de biomagnificação (Brooks, 1983).

Biomagnificação, é o processo pelo qual uma substância é absorvida por um organismo por intermédio da cadeia alimentar e apresenta concentrações cada vez maiores nos diversos organismos, de acordo com seu nível trófico. (Rusafa et al., 2000; Borga et al., 2001; Matsui, 2002).

Vários fatores influenciam a bioacumulação dos xenobióticos, como processos biológicos (ecologia alimentar, hábitos, fisiologia e bioquímica das espécies) e composição quali-quantitativa de compostos químicos no ambiente (Azevedo; Chasin, 2003).

Segundo D'amato et al. (2002), o processo de biomagnificação através da cadeia alimentar apresenta altas concentrações nos organismos de nível trófico mais elevado.

Para este estudo foram selecionadas as hortaliças: *Lactuca sativa* L. (alface), *Beta vulgaris* L. (beterraba), *Brassica oleracea* L. (brócolis), *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve), por serem culturas consumidas com muita frequência na alimentação humana, pois atualmente observa-se uma tendência de mudança de hábito alimentar do consumidor, através da conscientização sobre a importância nutricional das hortaliças (Cortez et al., 2002).

### 1.5.1 *Lactuca sativa* L. (alface)

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea, pertencente à família Cichoriaceae, a mesma das chicórias e almeirões. Atualmente cultivada em todos os continentes e sob as mais diversas condições ambientais, a alface é a hortaliça mais apreciada para elaboração de saladas (Pinto, 2007).

Pela sua enorme importância alimentar como fonte de vitaminas e sais minerais, destaca-se entre as hortaliças folhosas, sendo das mais consumidas em todo o mundo (Pinto, 2007). Pelo fato de ser consumida crua, conserva todas as suas propriedades nutritivas, sendo uma excelente fonte de vitaminas e minerais (Andrade Junior e Klar, 1997).

Uma planta de alface com 350 g apresenta, aproximadamente: 56 kCal, 95,80% de água, 2,3% de hidratos de carbono, 1,20% de proteínas, 0,20% de gorduras, 0,50% de sais minerais (13,3 mg de potássio, 147,0 mg de fósforo, 133,0 mg de cálcio e 3,85 mg de sódio, magnésio e ferro). Contém ainda vitamina A (245-UI), vitaminas de complexo B (B1 – 0,31 mg e B2 – 0,66 mg) e C (35,0 mg) (Franco, 1987).

A alface é uma hortaliça de grande importância econômica no Sul do Brasil (Segovia et al., 1997), e é considerada uma das espécies mais eficientes na absorção de metais pesados, apresentando comportamento diferencial quanto à quantidade e velocidade de absorção de macro e micronutrientes (Santos et al., 1999). Segundo Valério et al. (2007), *Lactuca sativa* L. demonstra diferentes níveis de fitotoxicidade, ajudando a caracterizar áreas com solos contaminados em que as concentrações elevadas de elementos solúveis são causadas por atividades humanas ou condições naturais em relação ao controle.

Vários autores referem que as espécies vegetais diferem quanto à capacidade de absorção e acumulação de metais pesados, considerando a alface uma das espécies mais eficientes na absorção e acumulação de metais pesados (Santos et al., 1999; Jordão et al., 2006; Pinto, 2007). Dinardi et al. (2000) consideram esta hortaliça uma planta hiperacumuladora de metais pesados (principalmente de Zn, Cu, Pb, Cd e Ni), em especial na parte aérea. A alface também é referida como uma das espécies folhosas propícias à acumulação de arsênio quando este se encontra disponível para absorção (Bunz et al., 2001), apresentando uma maior concentração nas raízes, devido à maior interação com o solo.

### 1.5.2 *Beta vulgaris L.* (beterraba)

A beterraba (*Beta vulgaris L.*) é uma hortaliça anual herbácea, pertencente à família Chenopodiaceae e cuja principal parte comestível é uma raiz tuberosa. A raiz pode ser consumida crua ou cozida, porém são nas folhas que estão concentradas as maiores quantidades de nutrientes e vitaminas por 100 gramas do produto, destacando-se cálcio, ferro, sódio, potássio e vitaminas A, B e C (Tivelli e Trani, 2008).

A beterraba (*Beta vulgaris L.*) é uma hortaliça que vem ganhando espaço e importância econômica no Brasil sendo, atualmente, uma das dez principais olerícolas produzidas no País. As raízes se caracterizam pelo sabor adocicado e coloração vermelha, devido à presença de betalaínas, substância antioxidante imprescindível na dieta humana (Kanner et al., 2001), além do alto valor nutricional e conteúdo de vitaminas e minerais, como K, Na, Fe, Cu e Zn (Ferreira & Tivelli, 1990).

Ela se destaca como uma das hortaliças mais ricas em ferro, tanto nas raízes quanto nas folhas. Normalmente, as folhas apresentam maior concentração em relação às raízes; desta forma, folhas e pecíolos devem ser aproveitados na alimentação pois, além de conter vitamina A, possui ótima quantidade de fibras e minerais.

A coloração púrpura do tubérculo, também presente nas folhas, nervuras e pecíolos, ocorre pelo acúmulo de pigmentos denominados betalaínas, os quais são muito usados na indústria de alimentos, como corante natural, e na indústria farmacêutica devido a sua propriedade antioxidante (Kanner et al., 2001; Hamerski et al., 2013). A beterraba é uma hortaliça bastante apreciada por apresentar sabor peculiar, elevado valor nutricional e versatilidade de formas de consumo (Júnior e Venzon, 2007).

Estudos de Sampaio et al., (2008), demonstraram que a Beterraba é uma planta bioindicadora na concentração de metais pesados (principalmente de Zn, Ni, Pb, Cu, Cd).

O cultivo dessa hortaliça possui melhor desenvolvimento em locais com temperaturas amenas, entre 10°C a 20°C, apresentando resistência ao frio intenso e geadas leves e sobre solos areno-argilosos bem drenados, por facilitar a emergência das plântulas (em semeadura direta) e o crescimento do tubérculo (Júnior e Venzon, 2007).

### 1.5.3 *Brassica oleracea* L. (brócolis)

O brócolis (*Brassica oleracea*) pertence à família da couve, é um vegetal cujo nome vem do italiano brocco, que significa broto, pois a brotação floral é a parte comestível, entretanto, são também consumidos os talos e as folhas, normalmente cozidos (Phillipi, 2006). O cultivo de brássicas tem destacada importância na olericultura orgânica brasileira, devido ao grande volume de produção, ao retorno econômico propiciado e ao valor nutricional das culturas (Peruch et al., 2006).

Durante a fase vegetativa, os brócolis produzem uma inflorescência de coloração verde, compacta, com formato tipo cabeça ou então inflorescências laterais (tipo ramoso) que são formadas por botões florais ainda fechados e pedúnculos tenros formando a parte comestível (Filgueira, 2000).

As Brassicas acumulam grandes quantidades de Fe, Mn, Zn, As, Cr, Ni, Cu na raiz, mas a transferência desses metais para a parte aérea das plantas é limitada e para as sementes mais ainda, o que garante sua qualidade como fonte de alimento humano (Mestek et al., 2007).

Nas folhas de brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck), há interação entre B (boro), Mo (molibdênio) e o metabolismo do oxigênio (Yang-Xian et al., 2000). As folhas dessa variedade têm a atividade da catalase e o conteúdo antiescorbútico elevados com aumentos nas concentrações desses dois micronutrientes, quando aplicados isoladamente. A aplicação combinada dos dois aumenta a capacidade produtiva das plantas e a atividade de enzimas protetoras contra efeitos deletérios de radicais livres nas células, como a superóxido dismutase, peroxidase, nitrato redutase, catalase e sistemas não enzimáticos como o ascorbato e os carotenóides (Burnell, 1988; Nie et al., 2007), o que torna essas plantas importantes para a saúde do homem.

O gênero *Brassica* reúne as espécies economicamente mais importantes da família em função da produção de óleos recomendados por cardiologistas; de condimentos, folhas, talos e flores para a alimentação, ricos em fibras, vitaminas, minerais, carotenóides e fitoquímicos móveis protetores da carcinogênese, o que as torna alvo de estudos relacionados à biotecnologia (Cardoza; Stewart Jr., 2004; Moïse et al., 2005; Harbaum et al., 2008).

O valor nutritivo dessa hortaliça varia de acordo com a parte da planta: em média possuem de 1% a 3% de proteínas, 4% a 24% de carboidratos, já os lipídeos, assim como as proteínas, costumam aparecer em pequena quantidade. As hortaliças verdes e folhosas são

ricas em minerais como potássio, magnésio, sódio, cálcio, ferro, zinco, cromo, selênio e outros minerais indispensáveis ao organismo (Ornelas, 2007).

Diante da importância nutricional atribuída à família das brássicas, o consumo dessas hortaliças poderia ser realizado de forma integral. No entanto, apenas as influorescências da couve-flor e do brócolis são aproveitadas. O restante (folhas e caules), considerado resíduo agrícola, é desprezado, mas poderia ser utilizado como fonte alternativa de nutrientes com papel importante em dietas balanceadas (Santos et al., 2003).

#### **1.5.4 *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve)**

A couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.) é classificada como uma hortaliça herbácea folhosa e faz parte de um complexo de cerca de 3.200 espécies inseridas em aproximadamente 350 gêneros da família *Brassicaceae*. É popularmente conhecida no Brasil como couve manteiga ou couve de folhas (Lima et al., 2007).

De origem de clima temperado (Costa norte mediterrânea na Europa e Ásia menor), a couve-folha (Rashid e Singhm, 2000; Filgueira 2008), adapta-se bem em regiões de clima frio (15 a 19°C) e ameno (20 a 25°C) (Peña e Hughes, 2007; Filgueira, 2008). As plantas apresentam caule ereto que produzem diversos rebentos e folhas lisas com variações em tons de verde, sendo no Brasil indistintamente produzido a cultivar manteiga (Filgueira, 2008), que tem multiplicado sua participação nos mercados em todo o mundo (Peña e Hughes, 2007).

O consumo da couve ocorre in natura ou minimamente processada, também em sucos, salgados e doces, estando sempre entre as hortaliças mais consumidas no mercado nacional, apresentando interessantes características organolépticas e nutrientes como vitaminas A, B1, B2, C, K, minerais, como cálcio e ferro, fibras e proteínas, além de composto bioativo como o glicosinolato e os flavonóides (Apak et al., 2007; Sebrae, 2008; Bevilacqua, 2011).

*Brassica oleracea* L. var. *acephala* é acumuladora de Se e apresenta alta quantidade de luteína e  $\beta$ -caroteno em seus tecidos, todos com propriedades anti-oxidantes (Lefsurd et al., 2006).

Nas folhas da *B. oleracea* L. var. *acephala* DC., estudos apontam para a presença dos ácidos fenólicos: gálico, protocatecuico, p-hidroxibenzóico, vanílico, salicílico, p-cumárico, cafeico, ferúlico e chiquímico, que são ativos contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, e *Bacillus subtilis*),

bactérias Gram-negativas (*Moraxella catarrhalis*) e contra fungos (fungos *Candida tropicalis* e *Candida albicans*) (Ayaz et al., 2008).

Também é possível observar a presença de vários aminoácidos: glutamato, prolina, aspartato, leucina, lisina, valina, arginina, alanina, tirosina, fenilalanina, treonina, histidina, serina, glicina e metionina, confirmando a presença de proteínas na planta (Kim, 2003; Pedroche et al., 2004; Lisiewska et al., 2008). Quanto à presença de flavonóides, podem-se encontrar na couve principalmente quercetina e campferol, principalmente na forma glicosilada. Tais flavonóides estão descritos para as mais diversas atividades, principalmente como antimutagênico e anticarcinogênico

Existem muitos relatos no Brasil indicando que o suco preparado das folhas de couve na medicina tradicional, e também ingerida durante a alimentação, proporciona um alívio nos sintomas da úlcera gástrica e também com ação em outras doenças, como diabetes mellitus, cirrose e reumatismo (Moreira et al., 2002; Miron et al., 2006; Lima et al., 2007; Santos e Lima, 2008). Alguns estudos também têm demonstrado a relação entre compostos presentes nas plantas do gênero *Brassica* e a prevenção do câncer, principalmente o de mama (Gerber et al., 2003; Padilha e Pinheiro, 2004).

## 1.6 JUSTIFICATIVA

Os vegetais são alimentos muito explorados atualmente, principalmente por sua composição química benéfica para a saúde. Os compostos fenólicos são comumente encontrados tanto em plantas comestíveis como não comestíveis, os quais têm sido atribuídos vários efeitos biológicos (Roginsky; Lissi, 2005).

Dentre as propriedades biológicas apresentadas por estes compostos podem-se destacar as atividades antialérgica, antiarteriogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora, entretanto a principal atividade tem sido a relacionada com a sua ação antioxidante (Andreo; Jorge, 2006).

Estudos recentes têm mostrado a importância do consumo de vegetais para uma dieta saudável e prevenção de doenças. As vitaminas e fitoquímicos, como ácido ascórbico, carotenóides, compostos fenólicos e fibras, têm sido consideradas como as substâncias bioativas de maior importância (Szeto; Kwok; Benzie, 2004).

A crescente conscientização para o valor de vegetais e frutas na dieta humana sugere que o monitoramento da concentração de metais pesados nos alimentos deva ser realizado com frequência. Como o teor

de metais pesados nos alimentos é dependente da sua quantidade presente nos solos, é muito importante também o monitoramento dos teores desses elementos no ambiente agrícola (Fior, 2012)

O solo é a base da cadeia alimentar terrestre sendo a sua qualidade um fator fundamental para a produção de alimentos seguros e de qualidade (Franz et al., 2008; Vrščaj et al., 2008; Ajmone-Marsan e Biasioli, 2010; Luo et al., 2011).

O impacto no solo, resultante da exploração de carvão, reflete essencialmente na sua contaminação e na perda da qualidade de solo arável. Segundo Favas (2008), a acidificação do solo bem como a sua contaminação por metais pesados, resultante da circulação de águas ácidas ou da deposição de poeiras contendo elementos resultantes da exploração do carvão, são os aspectos mais preocupantes.

As plantas podem ser afetadas quando expostas ao excesso de metais pesados em seu ambiente de crescimento. No solo, os metais podem provir tanto do material de origem quanto das atividades antrópicas (Cardoso et al., 2003).

A contaminação pela cadeia alimentar é uma importante via para entrada de poluentes tóxicos no corpo humano. A presença de metais pesados nas plantas depende da espécie vegetal, e também da eficiência de diferentes plantas na absorção de metais, que é avaliada através da sua captação ou dos fatores de transferência de metais entre solo-planta. Dessa maneira, hortaliças cultivadas em solos com metais pesados possuem um potencial de risco para a saúde de seus consumidores (Khan et al., 2008).

A segurança alimentar é uma das principais preocupações do público em todo o mundo (Radwan e Salama, 2006; Arora et al., 2008). A crescente demanda da segurança alimentar nas últimas décadas tem estimulado a investigação sobre o risco associado ao consumo de alimentos contaminados por pesticidas, metais pesados e / ou toxinas (D'mello, 2003; Radwan e Salama, 2006; Arora et al., 2008).

Os metais pesados estão entre os principais contaminantes de alimentos (Zaidi et al., 2005). Em geral, não são biodegradáveis, têm longas semi-vidas biológicas e podem acumular-se nos diferentes órgãos do corpo, conduzindo a efeitos secundários indesejados (Jarup, 2003; Sathawara et al., 2004; Arora et al., 2008) ou seja, afetam a saúde humana e o desenvolvimento (Wang et al., 2013).

No Brasil, não há trabalhos publicados que relacionem a exposição de humanos a elementos tóxicos e aos efeitos deletérios potenciais que os metais pesados causam, principalmente em se tratando do consumo de alimentos oriundos de áreas mineradas de carvão.

O presente estudo fundamentou-se na hipótese de que o consumo de hortaliças cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos da mineração e do beneficiamento do carvão representam riscos à saúde humana, utilizando o modelo animal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os danos a biomoléculas de camundongos submetidos à ingestão de hortaliças cultivadas em horta experimental, construída sobre depósito controlados de rejeitos do beneficiamento de carvão, analisando de forma indireta os riscos à saúde humana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o conteúdo total de elementos químicos através da técnica de indução de raios X por partículas (PIXE) em solo de horta experimental e em solos de horta orgânica;
- Determinar o conteúdo total de elementos químicos através da técnica de indução de raios X por partículas (PIXE) em hortaliças cultivadas em horta experimental e em hortaliças cultivadas em horta orgânica;
- Quantificar o conteúdo total de elementos químicos através da técnica de indução de raios X por partículas (PIXE), presentes no fígado de camundongos expostos a alimentação com hortaliças cultivadas em horta experimental e com hortaliças cultivadas em horta orgânica;
- Verificar o nível de danos ao DNA de células sanguíneas, hepáticas e cerebrais de camundongos expostos a alimentação com hortaliças cultivadas em horta experimental e hortaliças cultivadas em horta orgânica, utilizando o ensaio cometa;
- Verificar a possibilidade de reparo dos danos causados em células sanguíneas de camundongos expostos a alimentação com hortaliças cultivadas em horta experimental;
- Analisar os parâmetros de mutagenicidade (micronúcleos) em camundongos submetidos à alimentação com hortaliças cultivadas em horta experimental e hortaliças cultivadas em horta orgânica utilizando o teste de micronúcleo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 90 camundongos *Swiss* machos albinos saudáveis, com peso corporal médio de 33 a 40 g, com 60 dias de vida, obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC, Brasil). Eles foram divididos em 15 grupos (n=6). O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESC, Brasil (Anexo 1 - nº registro 110/2011).

Os procedimentos envolvendo os animais e seus cuidados estão de acordo com as leis e diretrizes nacionais e internacionais em pesquisas biomédicas (Brasil, 2008). Os camundongos foram alojados em caixas de polietileno (seis animais por caixa) sob temperatura ambiente padrão ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade ( $55 \pm 10\%$ ) e mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas. Medidas vigorosas foram tomadas de modo a assegurar o mínimo de desconforto e sofrimento para os animais. Além disso, utilizou-se o número mínimo de animais necessários para produzir dados científicos confiáveis.

#### 3.2 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em uma horta, construída sobre depósito controlados de rejeitos do beneficiamento de carvão e numa horta cultivada noutro ambiente de modo orgânico certificado pela ECOCERT BRASIL Certificadora Ltda. Segundo informação do responsável, na área minerada a última camada de rejeitos depositados foi recoberta por uma camada de aproximadamente 0,50 m de argila de alta densidade.

Sobre esta camada de argila foi espalhada uma camada de solo vegetal de aproximadamente 0,30 m, material obtido da zona superficial (0 a 0,30 m) do perfil natural do solo de uma área de empréstimo, e sobre esta camada de solo foram construídos os canteiros da horta. Os canteiros foram construídos a partir de uma mistura de solo vegetal, cama de aviário e cinza de casca de arroz queimada. Recebeu ainda, além de tais materiais, adubação química com adubo nitrogênio fósforo potássio NPK (Figura 5).

Segundo o produtor das hortaliças certificadas (Anexo 2), o solo foi submetido a adubação verde, vegetação espontânea, rotação de cultura, descanso, compostagem, cama de aviário e cinza de casca de

arroz. Na propriedade existem barreiras de árvores, que serve para proteger sobre possíveis contaminações dos vizinhos que não trabalham com produção orgânica.

Figura 5 - (A) localização da horta experimental na área de exploração de carvão.



Fonte: Google Maps.

### 3.3 HORTALIÇAS E PREPARO DA AMOSTRA

As hortaliças *Lactuca sativa* (alface-folhas), *Beta vulgaris* (beterraba-folhas), *Brassica oleracea L. var. Italica Plenck* (brócolis-folhas) e *Brassica oleracea L. var. Acephala D.C.* (couve - folhas) foram coletadas de uma horta construída sobre depósitos controlados de rejeitos do beneficiamento de carvão em uma mineradora nas proximidades do município de Criciúma. A escolha das hortaliças ocorreu pelo fato delas serem cultivadas para alimentação dos funcionários da mina e serem distribuídas aos seus familiares (Figura 6). As hortaliças orgânicas foram fornecidas por um produtor certificado (Anexo 2) de um município vizinho de Criciúma.

Figura 6 - Hortaliças utilizadas no estudo.



Fonte: autor (2012).

As hortaliças foram coletadas no mês de julho de 2012, nas duas localidades. Chegando ao laboratório foram lavadas em água corrente e em seguida com água deionizada para remover eventuais contaminantes foliares, como poeira ou lama, em seguida as folhas foram processadas em uma centrífuga de alimentos, onde foram colocadas aproximadamente 100 g de folhas para um rendimento médio de 50 mL de suco sem adição de água, sendo armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Chary; Kamala; Raj, 2008). O modelo animal de exposição às hortaliças se deu por via oral (gavagem) com o suco das folhas. Cada tratamento (agudo e crônico) foi administrado para um grupo composto de seis animais em uma dose de 0,1 mL/10 g de peso corporal.

### 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado através da administração de água destilada e suco das folhas das hortaliças. Os animais foram divididos em 15 grupos em dois tempos de tratamentos distintos, conforme descrito a seguir:

**Tratamento Agudo:** Uma única administração dos sucos das hortaliças e do controle com coletas de sangue em 3h, 6h e 24h, por punção na veia caudal, para análise de genotoxicidade.

**Grupo 1** - controle – administração de água destilada.

**Grupo 2** - suco da folha de alface cultivada de modo orgânico.

**Grupo 3** - suco da folha de alface cultivada sobre área de mineração.

**Grupo 4** - suco da folha de beterraba cultivada de modo orgânico.

**Grupo 5** - suco da folha de beterraba cultivada sobre área de mineração.

**Grupo 6** - suco da folha de brócolis cultivada de modo orgânico.

**Grupo 7** - suco da folha de brócolis cultivada sobre área de mineração.

**Grupo 8** - suco de folha de couve cultivada de modo orgânico.

**Grupo 9** - suco de folha de couve cultivada sobre área de mineração

Após 24 horas os animais foram eutanasiados por decapitação e foram coletadas amostras de tecidos, de córtex, fígado e medula óssea para análise de dano em DNA. A determinação da composição elementar mineral foi feita no fígado dos mesmos animais.

**Tratamento Crônico:** Administração contínua por 30 dias dos sucos das hortaliças (alface e couve), e controle com coleta de sangue em 2, 5, 10, e 30 dias, respectivamente, por punção na veia caudal, para análise de genotoxicidade.

As hortaliças utilizadas no tratamento crônico (alface e couve), foram selecionadas devido a sua capacidade de acumulação de metais pesados. Segundo Mapanda et al. (2007), os vegetais de folhas têm maior potencial de acumulação de metais pesados nas suas partes comestíveis do que as culturas de cereais ou frutas.

**Grupo 10** - controle – administração de água destilada.

**Grupo 11** - suco da folha de alface cultivada de modo orgânico.

**Grupo 12** - suco da folha de alface cultivada sobre área de mineração.

**Grupo 13** - suco de folha de couve cultivada de modo orgânico.

**Grupo 14** - suco de folha de couve cultivada sobre área de mineração.

**Grupo 15** - suco de folha de couve cultivada sobre área de mineração (para estudo de reparo).

Após 24 horas da última administração foi coletado sangue por punção da veia caudal para o ensaio cometa, os animais (exceto grupo 15) foram eutanasiados por decapitação e foram coletadas amostras de tecidos, de córtex, fígado e medula óssea para análise de dano em DNA.

A determinação da composição elementar mineral foi feita no fígado dos mesmos animais. Foram realizadas coletas de sangue por punção caudal do grupo 15 (reparo) com 24 horas e três dias após a última administração dos sucos para avaliação do sistema de reparo.

### 3.5 ANÁLISE ELEMENTAR ATRAVÉS DA EMISSÃO DE RAIOS-X INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE)

Foram coletadas nas duas áreas 12 subamostras de material em uma profundidade do solo (0 e 0,30 m e abaixo de 0,30 m) em cada canteiro onde cada hortaliça estudada foi cultivada. As 12 subamostras de cada profundidade foram reduzidas a três amostras compostas para cada canteiro e para cada profundidade, as quais foram submetidas aos procedimentos técnicos para a determinação da composição elementar do solo da área de exploração de carvão e orgânico através da análise de PIXE (Particle-induced X-ray Emission), de acordo com He et al. (1993) e Johansson et al. (1995). Esta técnica identifica a composição multi-elementar de uma amostra pelos raios-X emitidos quando um feixe de prótons interage com os átomos que constituem o material.

As amostras de solo da área de exploração de carvão e do orgânico para análise do PIXE foram peneiradas e secas em placas de Petri a 37°C por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram maceradas e prensadas na forma de pastilhas espessas para medições de PIXE. Para cada amostra de solo foram realizadas três análises.

Para todas as espécies de vegetais estudadas foi determinada a composição elementar presente nas folhas destas hortaliças, cultivadas tanto em área de exploração de carvão quanto em horta orgânica através da análise de PIXE.

As amostras (sucos das hortaliças) para as análises de PIXE foram secas em placas de Petri a 37°C por 72 horas. Posteriormente, os resíduos secos foram macerados e prensados na forma de pastilhas espessas para medições de PIXE. Para cada amostra de hortaliças, foram realizadas três medições.

A composição elementar do fígado dos camundongos alimentados com sucos das hortaliças *Lactuca sativa* (alface - folhas), *Beta vulgaris* (beterraba - folhas), *Brassica oleracea L. var. Italica Plenck* (brócolis - folhas) e *Brassica oleracea L. var. Acephala D.C.*

(couve - folhas) foi analisada também pela técnica de Emissão de Raios-X Induzida por Partículas (PIXE) (Johansson et al., 1995).

As amostras teciduais de fígado dos grupos para as análises de PIXE foram secas em placas de Petri a 37°C por 72 horas. Posteriormente, os resíduos secos foram macerados e prensados na forma de pastilhas espessas para medições de PIXE. Para cada amostra de fígado (um pool por grupo), foram realizadas três medições.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A principal instalação deste laboratório é um acelerador de partículas a 3 MV Tandetron que fornece um feixe de prótons a 2 MeV para medições de PIXE. As amostras foram acomodadas em um suporte dentro da câmara de reação (pressão de 10-6 mbar) e os raios-X foram detectados por um detector de Si(Li) (Sirius 80 e2v, Instrumentos Científicos) com resolução de 150 eV em 5,9 keV. Todas as amostras foram irradiadas durante 400 s, com uma corrente média de 3 nA.

As medições da Espectroscopia de retrodispersão de Rutherford (RBS) foram realizadas a fim de obter a massa relativa de luz (matriz), elementos como carbono, nitrogênio e oxigênio contemplado ao padrão de fígado bovino (Material de Referência Padrão 1577b). Um feixe 1,2 MeV He + uma corrente média entre 10 e 20 nA.cm<sup>-2</sup> foi empregado.

### 3.6 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue periférico foi coletado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de cérebro e fígado foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida elas foram individualmente rasgadas com uma pinça e após homogenizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular.

As células do sangue (alíquotas de 5 µL) e as células obtidas da dissociação de tecidos (alíquotas de 20 µL) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95 µL ou 80 µL, respectivamente) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%, w/v) e cobertas com uma lamínula (duas lâminas por indivíduo).

As lâminas foram brevemente mantidas por 5 minutos a 4°C para solidificar a agarose e as lamínulas foram cuidadosamente removidas. Em seguida, as lâminas foram imersas na solução de lise (2,5 M NaCl,

100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora. Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) durante 20 minutos para o desenovelamento do DNA, e a eletroforese foi feita no mesmo tampão. A eletroforese foi realizada durante 15 minutos a 300 mA e 25 V (0,7 V/cm).

Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em 400 mM Tris (pH 7,5) por 15 minutos (Collins, 1999) e, ao final, o DNA foi corado com nitrato de prata. Assim que as lâminas ficaram secas foram hidratadas com água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) por 5 minutos, em seguida, no escuro, adicionou-se à cubeta com as lâminas previamente hidratadas a solução uso composta por 44,7 mL A + 25,3 mL B (A = 50 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> completar até 1000 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>; B = 0,5 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 0,5 g de AgNO<sub>3</sub> + 1,28 g de H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>OSiW12 + 750 µL de CH<sub>2</sub>O completar até 500 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>), e levada ao banho-maria a 37° C por 20 minutos. Passado este tempo retirou-se a cubeta do banho e deixou-se por 20 minutos em temperatura ambiente, após retirou-se a solução da cubeta e em seguida adicionou-se a solução STOP (10 mL de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, completar até 1000 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) por 5 minutos, retirou-se a solução da cubeta e lavou-se as lâminas 1 vez em H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, e deixou-se secar para análise em microscópio óptico.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células são avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes que variam de 0 a 4 de acordo com o tamanho da cauda, sendo zero para ausência de cauda e 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins et al., 1997).

Desta forma, obtém-se um Índice de Danos (ID) para cada grupo 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 (Collins, 1999).

As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideraram que o escore visual de cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

### 3.7 TESTE DE MICRONÚCLEOS

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000). A medula óssea foi extraída a partir dos dois fêmures e um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas. Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC) foi analisada em 200 eritrócitos/animal.

Foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal, sendo a detecção dos efeitos de citotoxicidade realizada através da contagem de EPCs em relação aos eritrócitos normocromáticos (ENC) em 100 células (EPC/ENC) para o tratamento agudo. Para o tratamento crônico foram analisados 2000 EPCs e ENCs por animal (ou seja, 1000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x, sendo a detecção dos efeitos de citotoxicidade realizada através da contagem de EPCs em relação aos ENCs em 100 células (EPC/ENC).

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os espectros de PIXE foram analisados usando o software GUPIXWIN (Campbell et al., 2000). Para ambos os experimentos PIXE e RBS um padrão de fígado bovino foi medido sob as mesmas condições que as utilizadas para as análises das amostras teciduais dos camundongos (fígado), suco das hortaliças e solo. Os dados foram expressos como partes por milhão (mg/kg). A análise do RBS foi realizada com o código SIMRA (Mayer, 1977).

A análise estatística foi realizada com o software Bioestat 5.8.4. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, de seis animais para cada tempo em cada grupo. A normalidade das variáveis foi avaliada usando o teste Kolmogorov-Smirnov. O teste t de Student foi usado para comparar os grupos orgânico e mina com distribuição normal. Diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância de uma via (ANOVA). Quando ANOVA demonstrava diferença significativa ( $P < 0,05$ ), análises *post hoc* foram realizadas com o teste de Tukey. O nível crítico para a rejeição da hipótese nula foi considerado com um valor de  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE ELEMENTAR ATRAVÉS DA EMISSÃO DE RAIOS-X INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE)

As análises de PIXE no solo de área de exploração de carvão e orgânico identificaram e quantificaram doze elementos: magnésio (Mg), alumínio (Al), silício (Si), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), titânio (Ti), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn). O conteúdo total dos elementos químicos detectados no solo estão descritos em peso seco ( $\text{mg g}^{-1}$ ). Os resultados da análise elementar dos solos provenientes da área de exploração de carvão e orgânico estão representados na tabela 1.

A tabela 1 apresenta a composição elementar do solo da área de exploração de carvão e do solo da horta de cultivo orgânico. O solo da horta da área de mineração de carvão apresentou níveis elevados de elementos potencialmente tóxicos. Os teores totais de Si, P, Cu e Zn na área de mineração apresentam níveis mais elevados, quando comparados aos valores de referência apresentados por Allen (1989).

Todos os elementos analisados nos solos dos dois ambientes, apresentaram valores mais altos na área de mineração de carvão, quando comparados com o solo orgânico, embora nem todos tenham evidenciado valores significativamente mais elevados.

Os resultados demonstram nas concentrações elementares níveis significativamente maiores de Mg, S, Zn ( $P < 0,05$ ) e P, Ca, Mn ( $P < 0,01$ ) no solo oriundo de área de exploração de carvão comparados ao solo orgânico. A ordem de magnitude do conteúdo de elementos químicos, entre os que apresentaram diferenças significativas foi  $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{P} > \text{Mn} > \text{S} > \text{Zn}$ .

Tabela 1 - Composição elementar em Solo de Área de Exploração de Carvão e Orgânico através da análise de PIXE ( $\text{mg g}^{-1}$  dw).

Elementos	Solo	
	Orgânico	Mina
<b>Mg</b>	<b>2,676 ± 488.10</b>	<b>4,590 ± 1,029<sup>a</sup></b>
<b>Al</b>	<b>54,410 ± 5,948</b>	<b>58,930 ± 14,720</b>
<b>Si</b>	<b>361,200 ± 34,310</b>	<b>437,100 ± 202,000</b>
<b>P</b>	<b>964.70 ± 0.10</b>	<b>4,553 ± 1,22<sup>b</sup></b>
<b>S</b>	<b>268.70 ± 59.48</b>	<b>996.20 ± 368.00<sup>a</sup></b>
<b>K</b>	<b>3,151 ± 601.60</b>	<b>5,992 ± 1,743</b>
<b>Ca</b>	<b>3,848 ± 2,021</b>	<b>20,010 ± 4,400<sup>b</sup></b>
<b>Ti</b>	<b>12,520 ± 1,447</b>	<b>14,230 ± 5,187</b>
<b>Mn</b>	<b>333.00 ± 89.77</b>	<b>1,061 ± 195.00<sup>b</sup></b>
<b>Fe</b>	<b>34,060 ± 1,701</b>	<b>51,630 ± 9,183</b>
<b>Cu</b>	<b>110.3 ± 0.01</b>	<b>213.10 ± 74.62</b>
<b>Zn</b>	<b>82.84 ± 48.03</b>	<b>384.30 ± 109.80<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup>Significativamente diferente do solo orgânico ( $p < 0,05$ ). (Teste t de Student).

<sup>b</sup>Significativamente diferente do solo orgânico ( $p < 0,01$ ). (Teste t de Student).

As análises de PIXE em hortaliças (alface, beterraba, brócolis, couve) cultivadas em horta construídas em área de exploração de carvão e em solo orgânico identificaram e quantificaram dezenove elementos: sódio (Na), Mg, Al, Si, P, S, cloro (Cl), K, Ca, Ti, Cr (cromo), Mn, Fe, Ni (níquel), Cu, Zn, Br (bromo), Rb (rubídio), Sr (estrôncio). A análise do conteúdo total dos elementos químicos detectados nas hortaliças estão descritos em peso seco ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e apresentados na tabela 2.

O conteúdo total dos elementos químicos variaram entre as hortaliças estudadas (alface, beterraba, brócolis, couve). Alguns deles apresentaram teores maiores no suco das hortaliças cultivadas em solo orgânico, outros na área de mineração de carvão e vice-versa. Os teores totais de Mg, P, S e K foram maiores no suco de beterraba, brócolis e couve, quando comparados aos valores de referência apresentados por Allen (1989). Foi constatado níveis elevados de Ca no suco de brócolis, P no suco de couve e K no suco de alface. Os elementos Ca e Zn no suco de brócolis apresentaram teores maiores no solo orgânico e na área

de mineração de carvão, respectivamente e o teor de Fe foi maior no suco de alface cultivada em solo orgânico.

Os teores de P foram maiores ( $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ ) no suco de todas as hortaliças cultivadas na área de mineração de carvão, enquanto que os teores de Si, K e Zn foram maiores em três das quatro espécies de hortaliças utilizadas no estudo, cultivadas na área de mineração de carvão. Embora os teores de Si foram maiores na beterraba ( $P < 0,001$ ), brócolis ( $P < 0,01$ ) e alface ( $P < 0,05$ ), o teor de K foi maior no brócolis ( $P < 0,001$ ), couve ( $P < 0,01$ ) e na beterraba ( $P < 0,05$ ) e os teores de Zn foram maiores no brócolis e couve em ( $P < 0,001$ ) e na beterraba ( $P < 0,05$ ). Os teores de Ca e Fe, por sua vez, foram maiores nas amostras de área de mineração de carvão em duas das quatro espécies estudadas. Os teores de Ca foram maiores na beterraba ( $P < 0,001$ ) e na alface ( $P < 0,01$ ), os teores de Fe foram maiores na beterraba ( $P < 0,001$ ) e no brócolis ( $P < 0,01$ ). O teor de Mg foi superior ( $P < 0,01$ ) na área de mineração de carvão em uma das quatro espécies estudadas (beterraba).

Observamos, que os conteúdos totais de alguns elementos químicos foram mais elevados no suco das hortaliças cultivadas em solo orgânico, em comparação com os vegetais provenientes da área de exploração de carvão (tabela 2). São os casos de Mg, S e K ( $P < 0,001$ ) e Cu ( $P < 0,05$ ) na alface; S ( $P < 0,001$ ) e Cu ( $P < 0,05$ ) na beterraba; Mg e Ca ( $P < 0,001$ ) e S ( $P < 0,01$ ) no brócolis e; Mg ( $P < 0,001$ ) e Ca ( $P < 0,01$ ) na couve.

Tabela 2 - Composição elementar em Hortaliças cultivadas em Área de Exploração de Carvão e Orgânica através da análise de PIXE (mg g<sup>-1</sup> dw).

(continua)

Elementos	<i>Lactuca sativa</i>		<i>Beta vulgaris</i>		<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>		<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	
	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina
Na			28,910 ± 632.90	15,400 ± 827.10 <sup>c</sup>	10,060 ± 246.10	94.03 ± 90.88 <sup>c</sup>	6,778 ± 440.10	3,160 ± 328.40 <sup>c</sup>
Mg	3,572 ± 67.21	2,412 ± 122.30 <sup>c</sup>	24,690 ± 1,529	31,740 ± 510.20 <sup>b</sup>	11,220 ± 74.02	5,309 ± 186.80 <sup>c</sup>	9,221 ± 108.40	6,374 ± 365.60 <sup>c</sup>
Al			253.7 ± 31.27	248.40 ± 65.43	282.30 ± 52.30	4,979 ± 7,995	143.20 ± 44.65	171.70 ± 65.45
Si	598.60 ± 40.77	1,145 ± 216.70 <sup>a</sup>	465.1 ± 23.51	1,283 ± 107.50 <sup>c</sup>	467.50 ± 65.83	822.80 ± 61.74 <sup>b</sup>	369.70 ± 0.00	262.80 ± 58.19
P	5,295 ± 163.10	6,750 ± 36.43 <sup>c</sup>	4,126 ± 145.00	5,898 ± 330.70 <sup>b</sup>	4,783 ± 100.10	5,801 ± 107.80 <sup>c</sup>	4,196 ± 158.50	7,549 ± 639.40 <sup>c</sup>
S	3,038 ± 92.02	2,484 ± 51.94 <sup>c</sup>	4,899 ± 7.02	4,409 ± 17.95 <sup>c</sup>	13,300 ± 400.90	10,800 ± 388.40 <sup>b</sup>	13,250 ± 129.50	13,880 ± 1,161
Cl	45,310 ± 292.20	20,310 ± 382.30 <sup>c</sup>	15,500 ± 249.50	12,760 ± 381.90	35,020 ± 550.40	5,504 ± 280.10 <sup>c</sup>	32,910 ± 121.30	15,310 ± 1,002 <sup>c</sup>
K	120,200 ± 1,172	105,300 ± 1,988 <sup>c</sup>	75,610 ± 1,137	81,480 ± 1,899 <sup>a</sup>	43,560 ± 403.10	60,130 ± 950.00 <sup>c</sup>	47,370 ± 460.70	62,710 ± 3,853 <sup>b</sup>
Ca	8,679 ± 321.90	10,490 ± 448.70 <sup>b</sup>	12,270 ± 759.60	16,880 ± 431.00 <sup>c</sup>	50,240 ± 353.30	24,050 ± 243.80 <sup>c</sup>	38,240 ± 445.80	27,950 ± 2,136 <sup>b</sup>
Ti			31.41 ± 7.75	50.92 ± 15.39	18.32 ± 3.26	39.39 ± 14.20	15.79 ± 0.79	13.62 ± 2.15
Cr	176.80 ± 111.60	22.15 ± 0,00	3.04 ± 4.01	5.64 ± 0.10	2.36 ± 3.37	25.47 ± 7.81 <sup>b</sup>	1.86 ± 3.23	11.36 ± 3.58 <sup>a</sup>
Mn	40.29 ± 0.01	29.85 ± 2.89 <sup>b</sup>	76.36 ± 3.86	32.11 ± 2.61	39.46 ± 3.32	52.53 ± 52.46	25.05 ± 2.94	30.32 ± 2.93

Tabela 2 - Composição elementar em Hortaliças cultivadas em Área de Exploração de Carvão e Orgânica através da análise de PIXE ( $\text{mg g}^{-1}$  dw).

Elementos	(conclusão)							
	<i>Lactuca sativa</i>		<i>Beta vulgaris</i>		<i>Brassica oleracea var. italica</i>		<i>Brassica oleracea var. acephala</i>	
	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina
Fe	762.70 ± 326.00	345.70 ± 31.12	194.50 ± 11.74	342.10 ± 26.89 <sup>c</sup>	132.8 ± 16.04	264.60 ± 46.24 <sup>b</sup>	120.30 ± 47.47	274.60 ± 162.70
Ni	43.29 ± 21.08	2.71 ± 1.31 <sup>a</sup>	1.04 ± 1.25	3.86 ± 0.89	1.52 ± 1.97	9.82 ± 4.08 <sup>a</sup>	2.01 ± 3.48	5.73 ± 1.00
Cu	9.64 ± 2.40	4.05 ± 1.24 <sup>a</sup>	15.26 ± 0.12	13.15 ± 0.88 <sup>a</sup>	4.86 ± 0.86	5.72 ± 1.31	5.58 ± 1.01	5.58 ± 2.65
Zn	45.68 ± 1.54	61.25 ± 9.93	83.90 ± 6.18	111.50 ± 11.68 <sup>a</sup>	36.36 ± 8.51	121.8 ± 5.54 <sup>c</sup>	18.68 ± 6.16	102.10 ± 15.37 <sup>c</sup>
Br	97.29 ± 22.47	20.74 ± 9.33 <sup>b</sup>	210.90 ± 21.08	20.46 ± 12.88 <sup>c</sup>	194.40 ± 49.76	436.50 ± 27.99 <sup>b</sup>	171.80 ± 25.17	80.19 ± 13.86 <sup>b</sup>
Rb	141.2 ± 23.26	122.5 ± 28.66	93.89 ± 63.09	85.46 ± 14.17	70.37 ± 14.30	117.20 ± 9.80 <sup>b</sup>	106.60 ± 46.08	50.53 ± 22.06
Sr	6.90 ± 11.96	43.67 ± 10.88 <sup>a</sup>	49.66 ± 19.51	43.47 ± 2.46	275.80 ± 85.18	99.14 ± 25.38 <sup>a</sup>	193.20 ± 19.92	101.00 ± 8.76 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Significativamente diferente do orgânico ( $p < 0,05$ ) (Teste t de Student).

<sup>b</sup>Significativamente diferente do orgânico ( $p < 0,01$ ) (Teste t de Student).

<sup>c</sup>Significativamente diferente do orgânico ( $p < 0,001$ ) (Teste t de Student).

As análises de PIXE em fígado de camundongos expostos de forma aguda aos sucos de hortaliças (alface, beterraba, brócolis, couve) cultivadas em solo orgânico e em área de exploração de carvão identificaram e quantificaram treze elementos Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn. Todos os resultados estão expressos em peso seco ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e apresentados na tabela 3.

No brócolis verifica-se que os valores de Mg e S ( $P < 0,05$ ) e Ca ( $P < 0,01$ ) foram maiores no fígado dos animais, tratados com suco das hortaliças provenientes da área de exploração de carvão. Na couve, os teores de Mg, Si, S e Ca ( $P < 0,05$ ) no grupo da área de mineração de carvão foram maiores em comparação ao grupo tratado com suco das hortaliças cultivadas de modo orgânico. Por outro lado, os grupos de animais tratados com o suco de beterraba e de alface da área de mineração de carvão não apresentaram diferenças nos teores no fígado, a todos os elementos químicos estudados, em comparação com os valores do grupo orgânico.

Apenas os teores totais de S no suco de brócolis de áreas de mineração de carvão foram maiores quando comparados aos valores de referência apresentados por Allen (1989).

Tabela 3 - Composição elementar em Fígado de camundongos expostos de forma aguda aos sucos de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e Orgânica através da análise de PIXE ( $\text{mg g}^{-1}$  dw).

Elementos	<i>Lactuta sativa</i>		<i>Beta vulgaris</i>		<i>Brassica oleracea var. italica</i>		<i>Brassica oleracea var. acephala</i>	
	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina
Na	2,977 ± 214.70	5,176 ± 931.50 <sup>a</sup>	3,270 ± 88.79	4,005 ± 1,890	3,168 ± 167.90	5,386 ± 386.10 <sup>b</sup>	2,968 ± 126.40	6,406 ± 192.8 <sup>c</sup>
Mg	742.80 ± 41.39	696.50 ± 149.20	784.20 ± 51.57	983.10 ± 601.70	769.90 ± 27.99	1,070 ± 159.70 <sup>a</sup>	716.40 ± 92.86	1,041 ± 180.80 <sup>a</sup>
Al	330.30 ± 12.20	402.80 ± 55.03	433.10 ± 34.97	447.20 ± 144.60	611.90 ± 79.98	448.20 ± 77.57	490.90 ± 86.07	606.70 ± 203.90
Si	505.90 ± 28.43	496.10 ± 134.20	470.20 ± 144.90	810.20 ± 372.20	748.10 ± 103.10	707.80 ± 22.97	570.80 ± 289.00	1,122 ± 218.60 <sup>a</sup>
P	11,413 ± 197.30	10,522 ± 2,449	11,983 ± 334.50	10,922 ± 4,152	12,471 ± 239.30	13,150 ± 433.10	11,753 ± 791.00	13,606 ± 191.80
S	6,584 ± 239.70	5,960 ± 1,210	6,457 ± 64.07	7,631 ± 4,252	6,583 ± 60.92	12,061 ± 376.50 <sup>c</sup>	6,452 ± 142.30	11,967 ± 296.90 <sup>a</sup>
Cl	5,575 ± 90.07	8,579 ± 2,129	6,476 ± 170.70	6,357 ± 2,625	5,616 ± 77.89	8,687 ± 243.20 <sup>c</sup>	5,586 ± 241.50	9,868 ± 101.50 <sup>c</sup>
K	12,014 ± 220.70	9,504 ± 2,140	12,718 ± 696.70	9,784 ± 3,363	12,392 ± 190.20	11,493 ± 148.30 <sup>b</sup>	12,142 ± 553.80	11,990 ± 113.20
Ca	309.90 ± 116.80	422.20 ± 59.26	401.20 ± 120.00	454.10 ± 266.50	295.60 ± 40.18	750.00 ± 72.26 <sup>b</sup>	283.70 ± 58.59	804.90 ± 242.20 <sup>a</sup>
Mn	3.71 ± 1.27	3.68 ± 1.14	3.19 ± 1.89	3.91 ± 0.30	2.62 ± 0.67	4.75 ± 0.67 <sup>a</sup>	3.89 ± 1.59	3.63 ± 0.19
Fe	248.80 ± 4.48	249.7 ± 46.59	273.20 ± 59.34	275.80 ± 107.10	274.60 ± 10.15	281.30 ± 3.50	256.30 ± 25.85	310.20 ± 13.99
Cu	21.28 ± 0.88	13.63 ± 1.83	16.93 ± 3.38	21.23 ± 7.55	25.00 ± 2.68	28.10 ± 3.73	21.42 ± 3.03	24.91 ± 0.95
Zn	163.00 ± 11.35	130.40 ± 29.14	170.00 ± 15.99	154.00 ± 46.95	198.60 ± 7.65	173.40 ± 3.48 <sup>b</sup>	171.60 ± 22.94	181.90 ± 1.50

<sup>a</sup>Significativamente diferente do fígado de animais expostos ao suco de hortaliça de mesma espécie cultivada em solo orgânico ( $p < 0,05$ ) (Teste t de Student).

<sup>b</sup>Significativamente diferente do fígado de animais expostos ao suco de hortaliça de mesma espécie cultivada em solo orgânico ( $p < 0,01$ ) (Teste t de Student).

<sup>c</sup>Significativamente diferente do fígado de animais expostos ao suco de hortaliça de mesma espécie cultivada em solo orgânico ( $p < 0,001$ ) (Teste t de Student).

As análises de PIXE em fígado de camundongos expostos de forma crônica aos sucos de hortaliças (alface e couve), cultivadas em solo orgânico e em área de exploração de carvão, identificaram e quantificaram doze elementos Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, e Zn. Todos os resultados estão expressos em peso seco ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e apresentados na tabela 4.

Comparando o grupo de animais tratados com hortaliças provenientes da área de mineração com o grupo da hortaliças orgânicas, verifica-se que em relação a alface, os teores de P e K ( $P < 0,001$ ) e Cu ( $P < 0,01$ ) foram maiores nos fígados dos animais tratados com o suco das hortaliças da área de mineração. Os teores de Fe ( $P < 0,01$ ), por sua vez, foram mais baixos no fígado de animais tratados com suco das hortaliças da área de mineração em comparação com o sucos das hortaliças orgânicas. No caso da couve, os teores de Si ( $P < 0,01$ ), P, K, Zn e Fe ( $P < 0,001$ ) foram maiores no fígado do grupo de animais tratados com o suco das hortaliças da área de mineração de carvão.

Apenas os teores totais de S no suco da alface dos dois grupos (mina e orgânica) foram maiores quando comparados aos valores de referência apresentados por Allen (1989).

Tabela 4 - A Composição elementar em fígado de camundongos expostos de forma crônica aos sucos de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e Orgânica através da análise de PIXE (mg g<sup>-1</sup> dw).

Elementos	<i>Lactuca sativa</i>		<i>Brassica oleracea var. acephala</i>	
	Orgânico	Mina	Orgânico	Mina
Na	7,782 ± 182.40	6,765 ± 304.40	8,339 ± 652.50	5,449 ± 39.69 <sup>b</sup>
Mg	1,017 ± 76.50	1,108 ± 90.50	1,098 ± 87.31	1,220 ± 119.00
Al	609.60 ± 51.39	843.60 ± 138.20	652.00 ± 109.90	1,020 ± 127.80 <sup>a</sup>
Si	870.20 ± 33.43	995.30 ± 148.20	778.10 ± 118.00	1,294 ± 37.04 <sup>b</sup>
P	11,661 ± 237.90	13,786 ± 123.00 <sup>c</sup>	12,304 ± 102.60	14,214 ± 98.49 <sup>c</sup>
S	11,600 ± 323.60	11,990 ± 359.90	11,963 ± 162.20	11,931 ± 278.10
Cl	11,546 ± 242.90	9,590 ± 53.67 <sup>c</sup>	11,710 ± 442.00	8,400 ± 194.50 <sup>c</sup>
K	9,698 ± 175.90	12,658 ± 146.30 <sup>c</sup>	10,038 ± 129.50	12,625 ± 184.50 <sup>c</sup>
Ca			350.90 ± 54.06	386.40 ± 45.77
Fe	364.90 ± 23.34	274.40 ± 11.10 <sup>b</sup>	224.70 ± 14.42	314.40 ± 11.95 <sup>c</sup>
Cu	13.04 ± 2.12	18.75 ± 0.10 <sup>b</sup>	13.57 ± 0.94	15.66 ± 3.11
Zn	118.50 ± 12.70	135.40 ± 6.00	118.70 ± 6.24	149.70 ± 5.00 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Significativamente diferente do fígado de animais expostos ao suco de hortaliça de mesma espécie cultivada em solo orgânico (p<0,05) (Teste t de Student).

<sup>b</sup>Significativamente diferente do fígado de animais expostos ao suco de hortaliça de mesma espécie cultivada em solo orgânico (p<0,01) (Teste t de Student).

<sup>c</sup>Significativamente diferente do fígado de animais expostos ao suco de hortaliça de mesma espécie cultivada em solo orgânico (p<0,001) (Teste t de Student).

## 4.2 ENSAIO COMETA AGUDO

As avaliações dos dois parâmetros obtidos a partir do ensaio cometa (FD e ID) em sangue periférico nos tempos de exposição de 3, 6 e 24 horas e nos tecidos fígado e córtex de camundongos Swiss machos expostos de forma aguda aos sucos de folhas de hortaliças cultivadas em área de exploração de carvão e de hortaliças orgânicas estão apresentadas na tabela 5.

Analisando inicialmente o sangue periférico, pode-se observar elevados níveis de danos no DNA (FD e ID) nos grupos que receberam suco de beterraba ( $P < 0,001$  e  $P < 0,01$ ) e couve ( $P < 0,001$ ) cultivadas em áreas de mineração de carvão nos três diferentes tempos, em relação às amostras do grupo controle negativo e orgânico. O grupo de animais tratados com o suco de alface cultivada em área de mineração apresentou níveis elevados de danos no DNA (FD e ID) em sangue periférico apenas no tempo 6 horas ( $P < 0,05$ ) quando comparado com as amostras do grupo controle. Já os animais que receberam suco de brócolis cultivado em área de mineração tiveram uma diferença significativa no parâmetro ID ( $P < 0,05$ ) apenas no tempo 6 horas quando comparados com o grupo orgânico.

Analisando os dados relacionados aos tecidos, observa-se no fígado que o grupo mina tratado com suco de beterraba apresentou nível de dano significativamente maior em relação ao grupo controle e orgânico na FD, ( $P < 0,05$ ) e ID ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ ). Já o grupo mina tratado com suco de couve apresentou diferença significativa apenas no ID ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo orgânico.

Com relação ao córtex, observam-se elevados níveis de danos no DNA (FD e ID) nos grupos da mina que receberam suco de alface e couve (FD,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  e ID,  $P < 0,05$  e  $P < 0,001$ , respectivamente), diferindo significativamente do controle e das hortaliças orgânicas. Para a hortaliça brócolis a diferença foi de  $P < 0,001$  para ambos os parâmetros do ensaio cometa em relação ao controle e o grupo orgânico. Já o grupo mina que recebeu o suco de beterraba diferiu na FD ( $P < 0,05$ ) apenas em relação ao grupo controle negativo, enquanto no ID a diferença ( $P < 0,05$ ) se deu em relação aos grupos controle e orgânico.

Tabela 5 - Detecção de danos em DNA de sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma aguda aos sucos de folhas de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e solo Orgânico através do Ensaio Cometa.

(continua)

		Análise	Sangue periférico			Fígado	Córtex
			3 h	6 h	24 h		
Controle Negativo		FD	5,56 ± 3,91	5,43 ± 2,30	4,56 ± 1,81	53,00 ± 14,05	64,33 ± 6,12
		ID	8,11 ± 4,68	7,43 ± 4,54	7,44 ± 4,48	162,20 ± 49,74	214,17 ± 63,85
Alface	Orgânico	FD	10,83 ± 4,07	13,80 ± 8,01	12,00 ± 7,78	55,75 ± 23,74	52,25 ± 24,12
		ID	14,33 ± 7,50	18,00 ± 11,92	17,40 ± 11,97	132,00 ± 54,68	110,25 ± 62,22
	Mina	FD	9,67 ± 5,79	17,50 ± 9,25 <sup>a</sup>	8,78 ± 6,59	66,14 ± 5,64	90,63 ± 2,83 <sup>b,f</sup>
		ID	11,89 ± 6,31	27,50 ± 19,19 <sup>a</sup>	12,56 ± 12,10	191,86 ± 23,00	297,88 ± 45,14 <sup>a,f</sup>
Beterraba	Orgânico	FD	4,00 ± 3,39	2,40 ± 3,36	1,67 ± 2,66	56,50 ± 21,51	69,20 ± 31,11
		ID	6,00 ± 4,30	2,60 ± 3,71	3,00 ± 5,62	186,67 ± 112,10	215,60 ± 119,17
	Mina	FD	48,57 ± 12,14 <sup>c,f</sup>	38,00 ± 22,92 <sup>b,e</sup>	44,50 ± 15,84 <sup>c,f</sup>	83,14 ± 8,65 <sup>a,d</sup>	91,89 ± 8,12 <sup>a</sup>
		ID	64,00 ± 21,56 <sup>c,f</sup>	45,22 ± 20,41 <sup>c,f</sup>	74,38 ± 46,51 <sup>c,f</sup>	315,43 ± 42,28 <sup>b,d</sup>	344,00 ± 44,86 <sup>a,d</sup>
Brócolis	Orgânico	FD	0,83 ± 0,98	3,00 ± 2,00	2,67 ± 2,73	76,17 ± 22,52	49,25 ± 18,23
		ID	1,00 ± 1,27	3,50 ± 2,35	4,83 ± 5,64	225,83 ± 131,37	70,25 ± 34,76
	Mina	FD	3,29 ± 2,43	8,50 ± 6,65	3,56 ± 3,28	67,78 ± 15,23	93,11 ± 4,51 <sup>c,f</sup>
		ID	6,57 ± 4,47	17,13 ± 14,11 <sup>d</sup>	5,56 ± 5,20	218,89 ± 58,00	330,11 ± 29,21 <sup>c,f</sup>

Tabela 5 - Detecção de danos em DNA de sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma aguda aos sucos de folhas de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e solo Orgânico através do Ensaio Cometa.

(conclusão)

		Sangue periférico				Fígado	Córtex
	Análise	3 h	6 h	24 h			
Couve	Orgânico	FD	4,60 ± 4,39	6,00 ± 5,96	7,20 ± 4,44	45,33 ± 9,29	37,75 ± 23,16
		ID	9,40 ± 11,10	6,20 ± 6,22	11,80 ± 5,22	121,33 ± 39,53	79,75 ± 47,25
Mina	Mina	FD	32,00 ± 14,09 <sup>c,f</sup>	20,00 ± 4,30 <sup>c,f</sup>	39,40 ± 14,60 <sup>c,f</sup>	73,29 ± 18,89	92,71 ± 11,37 <sup>b,f</sup>
		ID	48,80 ± 18,94 <sup>c,f</sup>	39,40 ± 19,51 <sup>c,f</sup>	73,20 ± 26,98 <sup>c,f</sup>	240,43 ± 54,36 <sup>d</sup>	302,71 ± 62,18 <sup>a,f</sup>

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

<sup>a</sup>Diferença significativa em relação ao grupo CN com p<0,05 (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>b</sup>Diferença significativa em relação ao grupo CN com p<0,01 (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>c</sup>Diferença significativa em relação ao grupo CN com p<0,001 (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>d</sup>Diferença significativa em relação ao grupo Org com p<0,05 (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>e</sup>Diferença significativa em relação ao grupo Org com p<0,01 (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>f</sup>Diferença significativa em relação ao grupo Org com p<0,001 (ANOVA 1 Via, Tukey).

### 4.3 ENSAIO COMETA CRÔNICO

Parâmetros *in vivo* obtidos a partir do ensaio cometa (FD e ID) em sangue periférico nos tempos de exposição de 2, 5, 10 e 30 dias e nos tecidos fígado e córtex de camundongos Swiss machos expostos de forma crônica aos sucos de folhas de hortaliças cultivadas em área de exploração de carvão e de modo orgânico estão resumidos na tabela 6. Estes índices avaliam a genotoxicidade dos sucos de folhas destas hortaliças.

Elevados níveis de danos ao DNA (FD e ID) foram encontrados nas amostras de sangue periférico, nos grupos que receberam suco de alface e couve cultivadas em área de mineração em comparação ao controle, e às hortaliças orgânicas em todos os dias de coleta, assim discriminados: suco de alface e couve nos dias 2 e 10 apresentou diferença de  $P < 0,001$  para ID e FD em relação aos grupos controle e orgânico; dia 5, no suco da alface, diferenças em relação a FD de  $P < 0,01$  e  $P < 0,05$  com relação aos grupos controle e orgânico, respectivamente, enquanto que para ID as diferenças foram de  $P < 0,01$  comparando com o controle e o grupo orgânico.

No que se refere ao suco da couve no dia 5, os parâmetros FD e ID diferiram em relação ao controle e ao orgânico com diferença de  $P < 0,01$ ; na coleta de 30 dias o suco de alface (tanto para FD quanto para ID) apresentou diferença de  $P < 0,05$  em relação com as amostras do controle e orgânico, enquanto que a couve teve diferença de  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$  para FD e  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  para ID quando relacionada com o controle e com a hortaliça orgânica, respectivamente.

Analisando os dados relacionados aos tecidos, no tratamento crônico, observa-se que o fígado dos animais do grupo mina tratado com suco de alface apresentou nível de dano significativamente maior em relação ao grupo controle e ao orgânico na FD e ID, com valores de  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente. Com relação ao córtex, observam-se elevados níveis de danos no DNA tanto para FD quanto para ID ( $P < 0,01$ , em relação ao controle e ao orgânico) no grupo da mina que recebeu suco dessa mesma hortaliça.

Tabela 6 - Detecção de danos em DNA em sangue periférico em diferentes tempos, fígado e córtex de camundongos expostos de forma crônica aos sucos de folhas de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão, de maneira Orgânica e controle negativo usando o Ensaio Cometa.

		Sangue periférico				Fígado	Córtex
	Análise	2 dias	5 dias	10 dias	30 dias		
Controle Negativo	FD	3,33 ± 3,14	2,83 ± 2,99	1,00 ± 0,89	3,20 ± 2,68	22,60 ± 9,37	20,00 ± 6,73
	ID	8,33 ± 8,09	9,17 ± 10,46	2,50 ± 2,51	10,80 ± 9,96	74,60 ± 37,84	57,00 ± 21,2
Orgânico	FD	6,67 ± 4,50	6,83 ± 3,19	6,00 ± 3,95	3,00 ± 2,55	9,40 ± 6,43	24,50 ± 5,69
	ID	8,17 ± 4,88	10,83 ± 5,12	8,00 ± 5,51	3,80 ± 3,70	18,20 ± 15,99	64,00 ± 21,12
Alface	FD	58,67 ± 13,40 <sup>c,f</sup>	23,00 ± 14,45 <sup>b,d</sup>	44,40 ± 13,22 <sup>c,f</sup>	63,00 ± 15,92 <sup>a,d</sup>	49,33 ± 21,53 <sup>a,c</sup>	59,83 ± 20,61 <sup>b,e</sup>
	ID	128,17 ± 43,51 <sup>c,f</sup>	57,75 ± 34,08 <sup>b,e</sup>	113,00 ± 34,96 <sup>c,f</sup>	204,00 ± 66,43 <sup>ad</sup>	165,83 ± 78,73 <sup>a,e</sup>	166,00 ± 59,09 <sup>b,e</sup>
Mina	FD	7,17 ± 5,88	3,50 ± 2,59	1,17 ± 1,47	3,33 ± 3,06	30,00 ± 26,08	29,40 ± 14,89
	ID	13,33 ± 14,83	7,83 ± 8,04	3,50 ± 4,72	3,33 ± 3,06	93,50 ± 90,44	62,00 ± 19,35
Couve	FD	26,80 ± 7,60 <sup>c,f</sup>	25,33 ± 15,11 <sup>b,e</sup>	11,60 ± 5,32 <sup>c,f</sup>	31,89 ± 13,59 <sup>a,e</sup>	51,00 ± 19,41	36,33 ± 14,95
	ID	73,00 ± 23,04 <sup>c,f</sup>	67,67 ± 46,45 <sup>b,e</sup>	28,20 ± 12,48 <sup>c,f</sup>	67,11 ± 40,55 <sup>b,f</sup>	147,67 ± 78,65	78,33 ± 37,24

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

<sup>a</sup>Diferença significativa em relação ao grupo CN com p<0,05 (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>b</sup>Diferença significativa em relação ao grupo CN com p<0,01 (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>c</sup>Diferença significativa em relação ao grupo CN com p<0,001 (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>d</sup>Diferença significativa em relação ao grupo Org com p<0,05 (ANOVA 1 Via, Tukey).

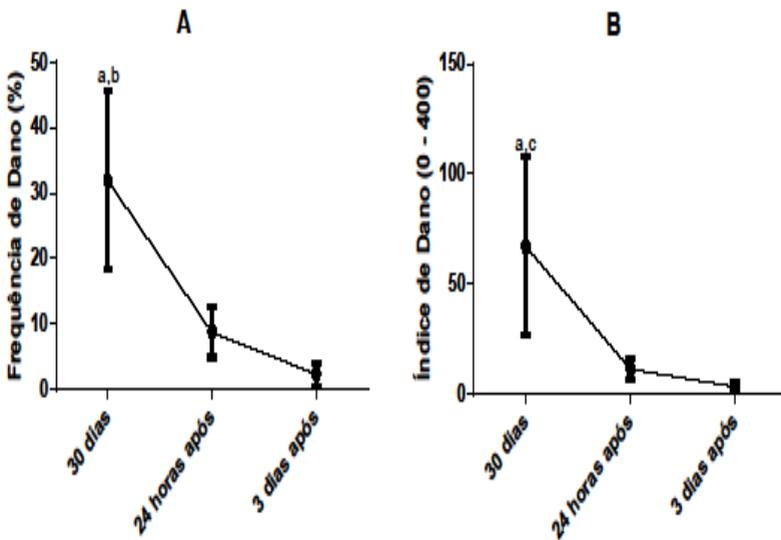
<sup>e</sup>Diferença significativa em relação ao grupo Org com p<0,01 (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>f</sup>Diferença significativa em relação ao grupo Org com p<0,001 (ANOVA 1 Via, Tukey).

Para verificar a possibilidade de reparo no DNA de células sanguíneas de camundongos expostos ao tratamento crônico com o suco de couve cultivada em área de rejeito de carvão foram realizadas coletas de sangue no 30º dia de tratamento, 24 horas e 3 dias após o término deste (Figura 7).

Observou-se que 24 horas após o término do tratamento os danos foram significativamente menores em relação ao grupo com coleta no 30º dia, com  $P < 0,01$  para a FD e  $P < 0,05$  para o ID, e 3 dias após o término houve uma redução ainda mais significativa em relação ao grupo com coleta no 30º dia, com  $P < 0,01$ , para ambos os parâmetros.

Figura 7 - Avaliação do reparo de DNA em células sanguíneas de camundongos expostos ao tratamento crônico com suco de couve cultivada em área de rejeito de exploração do carvão.



(A=Frequência de Dano; B= Índice de Dano)

a=Diferença significativa em relação ao grupo 3 dias após com  $p < 0,01$  (ANOVA 1 Via, Tukey).

b=Diferença significativa em relação ao grupo 24 horas após com  $p < 0,01$  (ANOVA 1 Via, Tukey).

c=Diferença significativa em relação ao grupo 24 horas após com  $p < 0,05$  (ANOVA 1 Via, Tukey).

#### 4.4 TESTE DE MICRONÚCLEOS

Para o teste de micronúcleos foi utilizado o esfregaço da medula óssea de camundongos expostos ao tratamento com sucos das hortaliças (alface, beterraba, brócolis, couve), cultivadas em área de exploração de carvão e de maneira orgânica, bem como ao controle negativo. Foram avaliados dois parâmetros: toxicidade (relação EPC/ENC) e mutagenicidade frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPCMN), e os resultados estão apresentados nas tabelas 7 e 8 (tratamento agudo e crônico, respectivamente).

Para a avaliação aguda os animais receberam uma dose única dos sucos das quatro hortaliças citadas acima e a coleta foi realizada 24 horas após a mesma. Na avaliação crônica os animais receberam os sucos apenas de alface e couve durante 30 dias e a coleta realizada no 30º dia.

No tratamento agudo foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0,001$ ) apenas no suco da hortaliça brócolis cultivada em área de mineração em relação ao grupo controle e ao orgânico para os EPCMN e diferença de  $P < 0,001$  em relação ao controle negativo no parâmetro toxicidade EPC/ENC (tabela 7).

Já no tratamento crônico não foram encontradas diferenças significativas no suco das hortaliças cultivadas em área de mineração tanto para EPCMN quanto para a relação entre EPC/ENC que indica citotoxicidade (tabela 8).

Tabela 7 - Avaliação da mutagenicidade em camundongos expostos ao tratamento agudo com sucos de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e de maneira Orgânica, bem como ao controle negativo, usando o Teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos.

		<b>EPCMN</b>	<b>EPC/ENC</b>
<b>Controle Negativo</b>		<b>0,13 ± 0,35</b>	<b>0,65 ± 0,10</b>
<b>Alface</b>	<b>Orgânica</b>	<b>0,17 ± 0,41</b>	<b>0,58 ± 0,04</b>
	<b>Mina</b>	<b>0,56 ± 0,73</b>	<b>0,65 ± 0,12</b>
<b>Beterraba</b>	<b>Orgânica</b>	<b>0,33 ± 0,52</b>	<b>0,55 ± 0,03</b>
	<b>Mina</b>	<b>0,22 ± 0,44</b>	<b>0,64 ± 0,15</b>
<b>Brócolis</b>	<b>Orgânica</b>	<b>0,60 ± 0,89</b>	<b>0,64 ± 0,07</b>
	<b>Mina</b>	<b>7,11 ± 2,32<sup>a,b</sup></b>	<b>1,55 ± 0,51<sup>a</sup></b>
<b>Couve</b>	<b>Orgânica</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,84 ± 0,06</b>
	<b>Mina</b>	<b>0,33 ± 0,50</b>	<b>0,75 ± 0,11</b>

EPC= Eritrócitos Policromáticos, ENC= Eritrócitos Normocromáticos, EPCMN= Eritrócitos Policromáticos Micronucleados, Valores apresentados como Média ± Desvio Padrão.

<sup>a</sup>Diferença significativa em relação ao grupo CN com  $p < 0,001$  (ANOVA 1 Via, Tukey).

<sup>b</sup>Diferença significativa em relação ao grupo Orgânico com  $p < 0,001$  (ANOVA 1 Via, Tukey).

Tabela 8 - Avaliação da mutagenicidade em camundongos expostos ao tratamento crônico com sucos de hortaliças cultivadas em área de Exploração de Carvão e de maneira Orgânica, bem como ao controle negativo, usando o Teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos.

		<b>EPC MN</b>	<b>ENC MN</b>	<b>EPC/ENC</b>
<b>Controle Negativo</b>			<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,57 ± 0,04</b>
<b>Alface</b>	<b>Orgânica</b>	<b>0,17 ± 0,41</b>	<b>0,17 ± 0,41</b>	<b>0,77 ± 0,09</b>
	<b>Mina</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,61 ± 0,12</b>
<b>Couve</b>	<b>Orgânica</b>	<b>0,33 ± 0,52</b>	<b>0,33 ± 0,52</b>	<b>0,63 ± 0,11</b>
	<b>Mina</b>	<b>0,83 ± 0,75</b>	<b>0,33 ± 0,52</b>	<b>0,54 ± 0,06</b>

EPC= Eritrócitos Policromáticos, ENC= Eritrócitos Normocromáticos, EPCMN= Eritrócitos Policromáticos Micronucleados, ENCMN= Eritrócitos Normocromáticos Micronucleados, Valores apresentados em Média ± Desvio Padrão (ANOVA 1 Via, Tukey).

## 5 DISCUSSÃO

Atividades de exploração de carvão na bacia carbonífera catarinense gera quantidades significativas de resíduos poluidores, que inicialmente foram sendo depositados na superfície, nas proximidades das minas, a medida que a produção foi aumentando e as frentes de lavra avançando, foram deixados em qualquer local sem a preocupação com o ambiente. A lavra mecanizada do carvão tem provocado alterações físicas, químicas e biológicas nos ecossistemas, resultando na poluição dos recursos hídricos, do solo e do ar e como consequência temos o aumento nas concentrações de metais pesados no ambiente. Este cenário alterou as características físico-químicas do solo e, os elementos tóxicos estão sendo absorvidos pelos vegetais.

Estudos de (Camargo et al., 2009; Kabata-Pendias, 2010), relatam que o teor total de um elemento químico no solo pode ser um indicador de potencial de toxicidade, além de trazer subsídios sobre as relações entre os elementos, a quantidade e distribuição no perfil do solo.

Nossos resultados mostram que todos os elementos analisados apresentaram teores mais elevados na área de exploração de carvão, quando comparado ao solo orgânico, embora nem todos tenham evidenciado diferenças significativas. Os maiores teores totais de Mg ( $4,590 \pm 1,029 \text{ mg g}^{-1}$ ), P ( $4553 \pm 1,22 \text{ mg g}^{-1}$ ), S ( $996,20 \pm 368,00 \text{ mg g}^{-1}$ ), Ca ( $20,010 \pm 4,400 \text{ mg g}^{-1}$ ) e Zn ( $384,30 \pm 109,80 \text{ mg g}^{-1}$ ) foram registrados no solo da horta na área de exploração de carvão. Corroborando com nossos resultados, outros estudos também demonstraram altos níveis de elementos químicos em solos construídos na recuperação de área degradada (Campos et al., 2010). Estudo de Campos et al. (2003) encontraram quantidades superiores de Mg e Ca no solo construído quando comparado ao solo pré-mineração. Ainda, estudo conduzido por Maçaneiro (2001) mostrou aumento significativo de Ca após tratar solos construídos com calcário e adubos orgânicos. Bhuiyan et al. (2010), estudando a poluição causada por metais pesados em solos de minas de carvão utilizado na agricultura ao norte de Bangladesh, encontraram concentrações de K e Ca na faixa de 10.400 - 24.400 (média de  $17.360 \pm 4.348 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e 12.600 - 77.000  $\text{mg kg}^{-1}$  (média de  $33.520 \pm 17.053 \text{ mg kg}^{-1}$ ), respectivamente.

Em nosso estudo os teores totais dos macronutrientes fósforo e cálcio no solo da horta de exploração de carvão foram  $4,553 \pm 1,22 \text{ mg g}^{-1}$  e  $20,010 \pm 4,400 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente, sendo que na horta do solo orgânico foram  $964,70 \pm 0,10 \text{ mg g}^{-1}$  e  $3.848 \pm 2.021 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente. O fósforo desempenha um papel importante na

fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, divisão e crescimento celular e várias outras propriedades na planta (Sadhu et al., 2012), enquanto que o cálcio é um componente relativamente comum de vários minerais do solo (Kabata-Pendias, 2010) e é responsável pela tolerância de metais pesados nas plantas (Al, Cu e Mn), além de atuar na formação e integridade da parede das membranas celulares (Malavolta, 1976).

Em relação aos outros elementos (metais pesados), Sadhu et al. (2012) analisando solos de minas de carvão em Raniganj oeste de Bengal, na Índia, encontraram os seguintes teores de Fe  $35,76 \text{ g kg}^{-1}$ , Cu  $17,25 \text{ g kg}^{-1}$  e Zn  $47,47 \text{ g kg}^{-1}$ , embora não houve diferenças significativas no teor de metais pesados no solo de mina quando comparado ao solo natural. Bhuiyan et al. (2010), por sua vez, registraram nos seus estudos que os solos agrícolas que foram irrigados com água provenientes da drenagem de minas continham níveis muito elevados de elementos potencialmente tóxicos, embora os teores totais variaram consideravelmente, dependendo da localização das amostras. As concentrações de Fe foram de  $36.300 - 78.000 \text{ mg kg}^{-1}$  e a média de  $59.853 \pm 13.318 \text{ mg kg}^{-1}$ ; Zn  $129 - 470 \text{ mg kg}^{-1}$  e a média de  $296 \pm 70 \text{ mg kg}^{-1}$ . Estes valores são semelhantes aos nossos resultados encontrados no solo da horta proveniente da área de exploração de carvão, onde Fe ( $51.630 \pm 9.183 \text{ mg g}^{-1}$ ), e Zn ( $384,30 \pm 109,80 \text{ mg g}^{-1}$ ). Bhuiyan et al. (2010), concluiu que as concentrações de Zn encontradas em seu estudo são motivos de preocupação para a saúde humana e para o ambiente, o que sugere que os nossos valores de Zn estão na mesma situação. Türkdoğan et al. (2003) ao investigarem os níveis de sete metais pesados (Co, Cd, Pb, Zn, Mn, Ni e Cu) em amostras de solo, de frutas e vegetais em Van região leste da Turquia, onde os cânceres gastrointestinais são endêmicos, encontraram os seguintes valores de Cu  $9-31 \text{ mg g}^{-1}$ , com média de  $20 \pm 6 \text{ mg g}^{-1}$  e Zn  $6 - 28,5 \text{ mg g}^{-1}$ , com valor médio de  $12,1 \pm 6,1 \text{ mg g}^{-1}$ . Em estudo conduzido por Gonzalez-Fernandez et al. (2011) encontraram teor médio de Zn de  $300 \text{ mg/kg}$  em solo de horta construída em área de mineração. O valor limite de Zn para solos de uso agrícola, segundo a resolução do CONAMA 420/2009, é de  $300 \text{ mg/kg}$ , o que nos mostra que no nosso estudo obtivemos níveis maiores que os preconizados (BRASIL, 2009). Nossos resultados no Cu ( $213,10 \pm 74,62 \text{ mg g}^{-1}$ ) e Zn ( $384,3 \pm 109,8 \text{ mg g}^{-1}$ ) no solo da horta de mineração de carvão, são motivos de preocupação para a saúde humana e para o ambiente.

Sabe-se que no solo os metais podem provir tanto do material de origem quanto das atividades industriais, urbanas ou agrícolas (Cardoso

et al., 2003). Além disso, uma das principais vias de contaminação do solo é através da deposição de metais pesados a partir de fontes metalíferas pontuais como a mineração, fundição, atividades agrícolas e industriais. Destacando-se que a absorção foliar das emissões atmosféricas de metais pesados também tem sido identificada como uma importante via de contaminação metálica em culturas vegetais (Villatoro-Pulido et al., 2009).

Em áreas de mineração de carvão, ou em depósitos de resíduos desta atividade, surgem muitos problemas ambientais. Um dos principais problemas está associado com a quantidade de pirita, onde a sua oxidação acaba tornando o solo muito ácido. Recém exposta ao ambiente a pirita muitas vezes tem um pH quase neutro, após a oxidação, os valores do pH podem cair drasticamente, entre os valores de 2,0 a 3,5 (Daniels et al., 1995). O pH do material não dependerá só do teor de pirita, mas do tempo de exposição e da sua capacidade de neutralizar a acidez (Bradshaw et al., 1982; Daniels et al., 1995). A taxa de oxidação da pirita e a produção de acidez é geralmente mais elevada na camada superficial, que é também a zona utilizada pelas raízes das plantas. Uma diminuição do pH libera concentrações de íons metálicos tóxicos solúveis no solo e reduz a disponibilidade de muitos nutrientes nas plantas. Quando o pH cai abaixo de 4,5, o crescimento das raízes de muitas espécies de plantas cessa (Daniels et al., 1995).

Em nosso estudo identificamos que alguns elementos químicos como o P, Si, K, Zn, Ca, Mg e Fe foram maiores em algumas hortaliças cultivadas em área de exploração de carvão, enquanto outros Mg, S, K, Ca e Cu foram maiores em algumas hortaliças cultivadas em solo orgânico. Estes resultados corroboram com Alexander et al. (2006), que relataram sobre a tendência de variações genotípicas relacionadas com o acúmulo de elementos químicos em vegetais, se apresentando como baixa em leguminosas, moderada nas raízes, e rica em vegetais folhosos. Corroboram também Kabata-Pendias (2010), segundo a qual a seleção biológica de elementos químicos permite as plantas controlar a sua composição química, em relação aos oligoelementos. Por isso, as concentrações de oligoelementos em plantas são muitas vezes relacionadas com a abundância desses elementos em solos e até mesmo em rochas subjacentes.

Encontramos no suco das hortaliças cultivadas na área de exploração de carvão os seguintes valores Mg que variam de  $2.412 \pm 122 \text{ mg g}^{-1}$  para  $31.740 \pm 510 \text{ mg g}^{-1}$ ; Si valores de  $262,80 \pm 58,19 \text{ mg g}^{-1}$  para  $1.283 \pm 107,50 \text{ mg g}^{-1}$ ; Os valores de P a partir de  $5.801 \pm 107,80 \text{ mg g}^{-1}$  para  $7.549 \pm 639,40 \text{ mg g}^{-1}$ ; Os valores de S de  $2.484 \pm 51,84 \text{ mg g}^{-1}$

$g^{-1}$  para  $13.880 \pm 1.161 \text{ mg } g^{-1}$ ; K valores de  $60.130 \pm 950 \text{ mg } g^{-1}$  a  $105.300 \pm 1,988 \text{ mg } g^{-1}$ ; Valores Ca de  $10.490 \pm 448,70 \text{ mg } g^{-1}$  para  $27.950 \pm 2.136 \text{ mg } g^{-1}$ ; Valores Fe de  $264,60 \pm 46,24 \text{ mg } g^{-1}$  para  $345,70 \pm 31,12 \text{ mg } g^{-1}$ ; Valores de Cu de  $4,05 \pm 1,24 \text{ mg } g^{-1}$  para  $13,15 \pm 0,88 \text{ mg } g^{-1}$ ; e; Zn de  $61,25 \pm 9,93 \text{ mg } g^{-1}$  para  $121,8 \pm 5,54 \text{ mg } g^{-1}$ .

Menezes et al. (2013) encontraram concentrações semelhantes aos do nosso estudo nos elementos químicos Mg ( $2.143 \text{ mg } g^{-1}$ ), Si ( $5.789 \text{ mg } g^{-1}$ ), S ( $2.644 \text{ mg } g^{-1}$ ), Ca ( $9.518 \text{ mg } g^{-1}$ ), Fe ( $335 \text{ mg } g^{-1}$ ), Cu ( $11 \text{ mg } g^{-1}$ ), e Zn ( $116 \text{ mg } g^{-1}$ ) na *Baccharis trimera* (Less) DC (carqueja) cultivada em solo piritoso.

Estudo de Amim et al. (2013) analisaram o acúmulo de metais pesados nas folhas de *Allium cepa* (cebola), *Allium sativum* (alho), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Solanum melongena* (berinjela) irrigadas com águas residuais no distrito de Mardan, no Paquistão, onde as concentrações de Cu e Zn, estão descritas a seguir. Valores de Cu: ( $20.7 - 26.1 \text{ mg } kg^{-1}$ ) na folha de cebola, ( $19.9 - 16.9 \text{ mg } kg^{-1}$ ) na folha de alho, ( $41.25 - 62.95 \text{ mg } kg^{-1}$ ) na folha de tomate e ( $32 - 8.95 \text{ mg } kg^{-1}$ ) na folha de berinjela. Valores de Zn: ( $21.65 - 31.5 \text{ mg } kg^{-1}$ ) na folha de cebola, ( $13.85 - 12 \text{ mg } kg^{-1}$ ) na folha de alho, ( $32.15 - 70.4 \text{ mg } kg^{-1}$ ) na folha de tomate e ( $52.1 - 6.55 \text{ mg } kg^{-1}$ ) na folha de berinjela. Comparando os dados com o nosso estudo as concentrações de Cu e Zn apresentam valores semelhantes aos nossos resultados.

Hussein e Bruggeman (1997) e Dogheim et al. (2004), encontraram valores de Cu iguais a  $0,92 \text{ mg } kg^{-1}$ , em vegetais folhosos no Egito; Bahemuka e Mubofu (1999), registraram valores de Cu que variam de  $0,25 - 0,58 \text{ mg } kg^{-1}$  e os de Zn  $1,48 - 1,59 \text{ mg } kg^{-1}$  em alface na Tanzânia; Onianwa et al. (2001), por sua vez, encontraram valores de Cu e Zn iguais a  $0,72$  e  $2,30 \text{ mg } kg^{-1}$ , respectivamente, em alface na Nigéria e, para frutas e legumes o conteúdo de Cu foi entre  $54 - 105 \text{ mg } g^{-1}$  com uma média de  $70 \pm 16 \text{ mg } g^{-1}$  e Zn foi entre  $20 - 89 \text{ mg } g^{-1}$  com uma média de  $44 \pm 22 \text{ mg } g^{-1}$ ; Türkdoğan et al. (2002) registraram em frutas e legumes valores de Cu entre  $4,05 \pm 1,24 \text{ mg } g^{-1}$  e  $13,15 \pm 0,58 \text{ mg } g^{-1}$  e, os valores de Zn de  $61,25 \pm 9,93 \text{ mg } g^{-1}$  e  $121,8 \pm 5,54 \text{ mg } g^{-1}$  respectivamente; Radwan e Salama (2006) estudando os teores de metais pesados em vegetais e frutas do Egito provenientes de mercado encontraram valores de Cu na alface variando  $1,82 - 2,22 \text{ mg } kg^{-1}$  com a média de  $1,97 \pm 0,07 \text{ mg } kg^{-1}$  e Zn  $7.8$  a  $12 \text{ mg } kg^{-1}$  e o valor médio de  $9,76 \pm 0,07 \text{ mg } kg^{-1}$ .

Em nosso estudo os valores de Cu e Zn detectado no suco das hortaliças cultivadas na área de exploração do carvão, sem considerar a espécie, em particular, foram muito mais elevados do que os valores

detectados pelos autores citados acima. O mesmo caso foi registrado, para o suco da alface da área de mineração para os metais pesados, Cu ( $4,05 \pm 1,24 \text{ mg g}^{-1}$ ) e Zn ( $61,25 \pm 9,93 \text{ mg g}^{-1}$ ), onde os valores encontrados foram maiores do que os descritos por Hussein e Bruggeman (1997) e Dogheim et al. (2004), e Bahemuka e Mubofu (1999), Onianwa et al. (2001), com excessão dos valores do Zn descritos por Türkdoğan et al. (2002). Os autores citados concluíram que toxinas ambientais, metais pesados e a má nutrição parecem desempenhar importantes papéis etiológicos na carcinogênese.

O conteúdo total dos elementos químicos encontrados nas hortaliças cultivadas na área de exploração de carvão, mostram que a concentração elementar no suco, sem considerar as espécies foi na ordem de  $\text{K} > \text{Mg} > \text{Ca} > \text{S} > \text{P} > \text{Si} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Fe}$ . Se analisarmos em cada espécie somente a relação dos teores de metais pesados, verifica-se que a ordem era  $\text{Fe} > \text{Zn} > \text{Cu}$  para todas as hortaliças analisadas. Estes resultados corroboram com Arora et al. (2008), que avaliaram os níveis de diferentes metais pesados como o ferro, manganês, cobre e zinco, em hortaliças irrigadas com água a partir de diferentes fontes na Índia.

As diferenças nos teores dos metais nos sucos das hortaliças da área de exploração de carvão e do solo orgânico, depende da natureza física e química do solo e da capacidade de absorção de cada metal pela espécie de cada hortaliça, o qual é alterado por fatores ambientais, interferência humana, e a natureza da planta (Brooks, 1983; Zurera-Cosano et al., 1989). Todos os vegetais tinham níveis mais baixos de cobre e maiores de zinco do que os valores máximos admissíveis ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$  para Cu e  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  de Zn) em alimentos propostos pela FAO / OMS (Codex Alimentarius Commission., 1984) e as concentrações nos vegetais apresentado por Allen (1989).

Igualmente aos animais, as plantas também podem ser danificadas quando expostas ao excesso de metais pesados em seu ambiente de crescimento (Cardoso et al., 2003). Villatoro-Pulido et al. (2009) detectaram genotoxicidade em uma planta utilizada como fonte alimentícia cultivada em solos contaminados com metais. Este vegetal apresentou contaminação nas raízes e parte aérea, constituindo um risco para toda a cadeia alimentar, devido a efeitos adversos de metais.

Metais, em geral, são conhecidos por causar efeitos nocivos ao meio ambiente e à saúde humana (Walker et al., 2002). A contaminação ambiental com compostos contendo metais é uma questão problemática, porque eles têm toxicidade elevada, capacidade para a bioacumulação e o potencial para induzir danos ao material genético (Prá et al., 2006).

Segundo Clemens (2006), a absorção e acúmulo de metais tóxicos em espécies vegetais representa a principal via de entrada de efeitos nocivos à saúde a partir da alimentação humana e animal, destacando-se os metalóides mais preocupantes que são As, Se, Cd, Hg e Pb devido a seus efeitos nocivos. O autor ressalta ainda que as plantas possuem uma tolerância a níveis elevados de metais, o que pode ser mais prejudicial para os consumidores.

Ao longo dos últimos anos verificou-se uma preocupação crescente acerca da transferência de elementos traço para a cadeia alimentar. Têm sido publicados vários artigos e desenvolvidos vários estudos com a problemática da exposição da população através do consumo de hortaliças cultivadas nas imediações das zonas mineiras Liu et al. (2005b), Pruvot et al. (2006), Lim et al. (2008), Onyedika e Nwosu (2008), Zhuang et al. (2009), El Hamiani et al. (2010), Harmanescu, et al. (2011), Gonzalez- Fernandes et al. (2011), Wu et al. (2011) e Wilberforce e Nwabue, (2013).

Os minerais são necessários para a vida humana e desempenham um importante papel nas funções metabólicas (Barroso et al., 2009; Turconi et al., 2009; Lobo et al., 2010; Leffa et al., 2014). De forma geral, os elementos minerais são absorvidos no trato gastrointestinal e armazenados nos tecidos celulares e no fígado. O fígado é um órgão importante do metabolismo, relacionado à desintoxicação, armazenamento e excreção de xenobióticos e seus metabólitos, por isso são especialmente vulneráveis a danos (Brzóska et al., 2003).

Sabe-se que o fígado é denominado de órgão-alvo de elementos como Cu, Zn, Al, Si, Rb e Fe (Ebina et al., 1984; Bissé et al., 2005; Goodman, 2005; Milman et al., 2006; Jomova e Valko, 2011). Além disso, o fígado frequentemente demonstra um claro aumento na dose-resposta dependente da concentração de metais após a exposição alimentar (Kan e Meijer, 2007; Jomova e Valko, 2011).

As necessidades diárias de micronutrientes em um homem adulto são as seguintes (em mg/dia): Ca (800-1200), P (700-800), Mg (300-400), Na (500), Fe (10-15), Zn (12-15), Cu (2-3) (Berdanier, 1998; Smolin e Grosvenor, 2000; Wildman e Medeiros, 2000). A ingestão diária recomendada (IDR) é estimada a partir da ingestão segura e adequada desses elementos por dia.

Um elemento torna-se tóxico se a sua concentração excede a sua ingestão diária máxima tolerável (IDMT) e esta varia de acordo com os diferentes elementos. Para o Zn, Cu, Fe e Mn, por exemplo, os níveis de IDMT para adultos são de 40, 10, 45 e 11 mg/dia, respectivamente,

enquanto que no caso do Ca a ingestão deve ser superior a 2000 mg/dia para ele se tornar tóxico (Olabanji et al., 2008).

Para verificar o risco de um poluente na saúde, é muito importante determinarmos o nível de contaminação, detectando as vias de exposição para os organismos alvo. Há vários caminhos possíveis de exposição a seres humanos, mas entre eles a cadeia alimentar é a via mais importante. Em nosso estudo usamos camundongos, que foram expostos ao tratamento agudo e crônico, utilizando suco de hortaliças, na qual analisamos o conteúdo total de elementos químicos em células hepáticas. No grupo de animais expostos ao tratamento agudo, os maiores níveis de Mg, S e Ca foram a partir do consumo de suco de brócolis e de couve, ambos provenientes da horta construída na área de exploração de carvão. Encontramos também no suco de couve, os maiores níveis de Si. Por outro lado, no grupo de animais expostos ao tratamento crônico, os maiores níveis de P, K e Cu foram a partir do consumo do suco de alface e de couve, na área de exploração de carvão, enquanto que os maiores níveis de Si, P, K, Fe e Zn foram encontrados no suco de couve.

Corroborando com os nossos resultados, Zocche et al. (2013), ao analisarem metais pesados no fígado do anfíbio *Hypsiobas faber*, em área de mineração de carvão, encontraram resultados semelhantes aos nossos do tratamento crônico, nos elementos Fe, Cu, Zn. Ainda Zocche et al. (2010b), ao avaliarem metais pesados em fígado de morcegos insetívoros em áreas de mineração de carvão, encontraram resultados semelhantes aos nossos nos elementos químicos, Si e Fe.

A Poluição por metais pesados nos solos agrícolas é um grande problema ambiental que pode afetar a produtividade da planta, a qualidade dos alimentos e a saúde humana (Alloway, 1990; Hansen e Jørgensen, 1991; McGrath et al., 2002; Kabata-Pendias, 2010). Por exemplo, Cu, Mn e Zn são nutrientes essenciais para as plantas (Marschner e Marschner, 2012), no entanto eles podem causar toxicidade em concentrações elevadas (Kabata-Pendias, 2010). Quando qualquer um destes elementos estão presentes no solo acima de suas concentrações, são necessárias medidas corretivas (Zheljzakov et al., 2008).

Os metais pesados são prejudiciais devido à sua natureza não biodegradável, meias-vidas longas e o seu acúmulo em vários órgãos do corpo, acarretando efeitos colaterais indesejáveis (Jarup, 2003; Sathawara et al., 2004; Radwan e Salama, 2006). A maior parte dos metais pesados são extremamente tóxicos devido à sua solubilidade na água. Mesmo baixas concentrações de metais pesados têm efeitos

prejudiciais para o homem e animais, porque não há nenhum mecanismo da sua eliminação do corpo (Arora et al., 2008). Os metais pesados, como Fe e Zn são facilmente acumulados nas partes comestíveis dos vegetais de folhas (hortaliças), quando comparados com os grãos e frutos (Mapanda et al., 2005; Kabata-Pendias, 2010). Hortaliças acumulam metais pesados nas partes comestíveis (Bahemuka e Mubofu, 1999) e as partes não comestíveis em quantidades elevadas podem causar problemas tanto nos animais como nos seres humanos ao consumirem estas plantas ricas em metais (Alam et al., 2003; Kabata - Pendias, 2010). Problemas de saúde graves podem surgir como resultado da absorção excessiva de metais pesados na dieta. Além disso, o consumo de alimentos contaminados com metais pesados pode esgotar alguns nutrientes essenciais no corpo, causando uma diminuição nas defesas imunológicas, retardo do crescimento intrauterino, comportamento psicossocial debilitado, dificuldades associadas à desnutrição e uma alta prevalência de câncer gastrointestinal superior (Arora et al., 2008).

Além da sua função como biocatalisador, o Cu é necessário para a pigmentação do corpo além do Fe, atua na manutenção do sistema nervoso central, na prevenção da anemia (Akinyele e Osibanjo, 1982). Metais como o cobre e o zinco são essenciais para importantes funções bioquímicas, fisiológicas e necessárias para manter a saúde ao longo da vida. A deficiência de zinco resulta em uma variedade de defeitos imunológicos, enquanto que a deficiência de cobre é caracterizada por anemia, neutropenia e anormalidades esqueléticas (Prentice, 1993; ATSDR, 1994; Linder e Hazegh-Azam, 1996).

Vários metais pesados possuem a capacidade para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando na peroxidação lipídica, danos no DNA e danos oxidativos (Stohs e Bagchi, 1995; Henkler et al., 2010; Zocche et al., 2013; Zocche et al., 2014) e alteraram a homeostase do cálcio (Stohs Bagchi, 1995). Os metais pesados iniciam o processo neoplásico por liberação de radicais livres, causando mutações no DNA (Peeters, 1987; Feig et al., 1994). Muitas pesquisas revelaram os efeitos cancerígenos de vários metais pesados (Feig et al., 1994; Trichopoulos et al., 1997) e de outros elementos químicos. Cu, por exemplo, aumenta o risco de carcinoma hepatocelular e renal em estudos com animais (Eagon et al., 1999; Giri et al., 1999), várias anomalias cromossômicas em mineiros foram descritas relacionadas com o Zn e Pb (Jackson, 1988; Bilban, 1998). O câncer hepatocelular e de esôfago são as neoplasias mais frequentes (45,4 e 19,8%, respectivamente), ocorridas em mineiros que trabalham em minas de ouro na África do Sul

(Bradshaw et al., 1982). Além disso, a incidência de câncer gástrico é aumentada em mineiros de carvão (Türkdoğan et al., 2003). León-Mejía et al. (2011), sugerem que a exposição aos resíduos resultantes da mineração de carvão, podem resultar num aumento de genotoxicidade em trabalhadores de minas de carvão.

Uma vez entendido que metais podem contribuir para um processo oxidativo, e que este compromete a função nuclear, avaliações de toxicidade genética se fazem oportunas. Vale ressaltar que avaliações de toxicidade genética não são uma medida de carcinogenicidade, mas são frequentemente usadas como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese, havendo alta associação entre respostas positivas nestes testes e carcinogenicidade, tanto em roedores como em humanos. Como resultado dessas considerações, os testes de toxicidade genética, como o ensaio cometa e o teste de micronúcleos, são amplamente aplicados em estudos clínicos para uma avaliação do espectro toxicológico (Ribeiro et al., 2003).

Enquanto o ensaio cometa permite uma medida direta de quebras simples e duplas de fitas de DNA, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas com o DNA e sítios de reparo com excisão incompleta (Singh et al., 1988; Fairbairn et al., 1995), o teste de micronúcleos providencia uma estimativa da quantidade induzida de mutações cromossômicas, através dos eventos de clastogênese e aneugênese (Krishna e Hayashi, 2000).

Em nosso estudo, o tratamento agudo e crônico de camundongos com suco de hortaliças, cultivadas em área de exploração de carvão e solo orgânico, resultou em danos no DNA, em todos os tipos de células analisadas em ambos os testes. Os animais que foram tratados com sucos das hortaliças da área de mineração de carvão obtiveram danos significativamente maiores comparados com os animais tratados com sucos de hortaliças cultivadas de modo orgânico e/ou controle. Em nossos resultados podemos observar que todos os sucos provenientes de hortaliças cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos da exploração de carvão, mesmo com todo o preparo do solo, foram genotóxicos tanto na forma aguda quanto crônica.

A diferença nos nossos resultados entre os dois testes provavelmente deve-se aos diferentes ensaios genotóxicos utilizados. O ensaio cometa detecta lesões no DNA que ainda podem ser reparadas, enquanto que o teste de micronúcleos detecta danos que não podem mais ser reparados. De fato, o ensaio cometa e o teste do Micronúcleo possuem naturezas distintas, cada um com suas vantagens e restrições, e

por isso têm sido aplicados em conjunto para a avaliação de danos genéticos.

Os danos mensurados pelo ensaio cometa aparecem mais cedo do que o micronúcleo, que requer uma divisão celular para ser visualizado (Da Silva Souza e Fontanetti, 2006). A maior parte do dano ao DNA é reparada pelo eficiente mecanismo celular de reparo, enquanto que uma pequena parte do dano resulta em mutação (Laus et al., 2006). Nossos resultados mostraram que os danos no DNA foram reparados após o término dos tratamentos, portanto não obtivemos diferenças significativas no teste de micronúcleos.

Encontramos na literatura trabalhos que discutem sobre a genotoxicidade do carvão, e os resultados nestes estudos estão em concordância com nossos. Da Silva et al. (2000a) e Da Silva et al. (2000b), através de estudos realizados com o ensaio cometa com o roedor *Ctenomys torquatus*, demonstraram que o carvão e seus subprodutos não apenas induziram danos em DNA de células sanguíneas, bem como produziram efeitos genotóxicos no organismo como um todo.

Para Léon et al. (2007), os mamíferos *Rattus rattus* e *Mus musculus* expostos a áreas mineradas por carvão apresentaram valores significativamente maiores de índice de danos (ID) e frequência de danos (FD), quando comparados aos animais da área controle, demonstrando também o efeito genotóxico desse mineral.

No estudo de Agostini et al. (1996) realizado com trabalhadores de uma mineradora em Criciúma constatou-se a existência de um risco aumentado de mutagenicidade, observado através da diminuição do índice mitótico, aumento de micronúcleos em células bucais e lesões cromossômicas em células sanguíneas. Leffa et al. (2010) expuseram moluscos *Helix aspersa*, a alface cultivada em horta experimental construída sobre depósito de rejeito de carvão, e obtiveram resultados semelhante aos nossos.

Segundo Silva et al. (2009), além dos metais pesados o carvão mineral bruto apresenta diversos óxidos, sendo caracterizados através de análises dos óxidos a partir da caracterização mineral, constatando a presença de  $Al_2O_3$ ,  $SiO_2$ , monóxido de cálcio (CaO), MgO,  $NaO_2$ ,  $K_2O$ ,  $F_2O_3$ , Dióxido de Titânio ( $TiO_2$ ),  $P_2O_5$  e  $SO_3$ . De acordo com Silva et al. (2009), numerosos outros estudos mostram que normalmente o carvão ocorre associado aos sulfetos, e durante a utilização, independente do que faz os oligoelementos ocorrerem, eles provavelmente serão emitidos para a atmosfera devido à sua volatilidade.

De acordo com Ferreira-Cravo et al. (2009), os danos no DNA podem ser passíveis ou não de reparo através do sistema de reparo celular. A partir disso, outra via indireta dos metais exercerem genotoxicidade no DNA é através da interferência do sistema de reparo, aumentando a mutagenicidade de outros agentes genotóxicos.

Na verdade, alguns compostos metálicos carcinogênicos em baixas concentrações têm sido identificados como inibidores do sistema de reparo de danos em DNA causados por fatores endógenos e/ou xenobióticos. A inibição persistente do reparo de danos no DNA resulta em instabilidade genômica, a qual pode tornar-se especialmente deletéria sob condições de acelerada proliferação celular e/ou apoptose prejudicada (Beyersmann e Hartwig, 2008).

Segundo Guo et al. (2008), o sistema de reparo existente no DNA consegue reverter danos oxidativos, bem como 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), que resulta de lesão oxidativa nas bases de nucleotídeos no genoma. Entretanto, o potencial aumento de incidências de erros durante a autorreparação do DNA não pode ser ignorado, pois podem ser responsáveis por mutações e tumores no corpo do indivíduo.

Prá et al. (2006), através de estudos com planárias e camundongos sobre danos no DNA a partir de sulfato de cobre, apontam que o sistema de reparo não volta ao seu nível basal de danos. Assim como os animais, as plantas também podem ser afetadas quando expostas ao excesso de metais pesados em seu ambiente de crescimento.

Nossos resultados se comportaram de forma semelhante aos achados de Guo et al. (2008), que investigou o dano ao DNA pelo ensaio cometa em leucócitos periféricos de camundongos. Observou-se um aumento de danos ao DNA de leucócitos periféricos, atingindo um pico de 1 hora após a administração do agente oxidante, quando comparados com o grupo controle. Dentro de 24 horas da administração aguda, os danos no DNA foram reparados e diminuíram para os mesmos níveis que os do grupo controle.

Como se pode observar em nossos resultados, após o término do tratamento crônico o grupo avaliado como reparo obteve uma redução significativa nos danos em apenas 24 horas, e em três dias voltou quase a um nível basal de danos. Já foi repetitivamente demonstrado que íons metálicos podem inibir a reparação de danos no DNA, mas a reparação do DNA é um processo importante para evitar a mutagênese (Galaris e Evangelou, 2002). No entanto, apesar do dano no DNA serem reparados, deve-se ter em mente que a possibilidade de mutações e desenvolvimento do câncer pode aumentar como um resultado de processos de reparação propensas a erros (Kido et al. 2006).

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

Compostos metálicos podem alterar o crescimento celular através de vários mecanismos distintos. As alterações na regulação dos genes são observadas antes de uma possível manifestação de tumores, estas podem não ser fixadas por mutações, sendo necessário um tempo muito prolongado de exposição para provocar modificações genéticas persistentes. Os íons metálicos podem desregular a proliferação celular através da inativação dos processos apoptóticos, o que resultaria em uma adaptação à citotoxicidade dos metais (Beyersmann e Hartwig, 2008).

Segundo Kalloo (2008), a *Brassica oleracea L. var. acephala* (couve) é uma rica fonte de vitamina C. Korus (2011) verificou que 100 g de folhas cruas de couve contêm 683 mg de vitamina C, e Korus e Lisiewska, (2011) confirmaram suas propriedades antioxidantes assemelhando-a ao Trolox (antioxidante comercial com propriedades conhecidas). Tais propriedades podem justificar a eficiência do sistema de reparo nos animais avaliados neste estudo.

Gonçalves et al. (2012) avaliaram o potencial genotóxico e/ou antigenotóxico do extrato hidroalcoólico da *Brassica oleracea L. var. acephala* D.C. em diferentes células de camundongos, e os resultados obtidos neste estudo mostraram que nenhuma das concentrações utilizadas mostrou efeito genotóxico pelo ensaio cometa, ou mutagênico pelo teste de micronúcleo. E, além disso, a couve teve efeito antigenotóxico, sendo capaz de promover uma inibição de dano em DNA induzido pela doxorubicina, efeito este que poderia ser justificado pela presença de antioxidantes no extrato administrado.

Fagundes (2012) demonstrou através do ensaio cometa de células sanguíneas de camundongos a ação protetora e de reparo da hortalíça couve aos danos ao DNA em um pré e um pós-tratamento com Metil Metano Sulfonato (MMS) e Ciclofosfamida (CP). O que nos leva à possibilidade de que a couve tenha exercido um efeito protetivo ao DNA dos camundongos utilizados no nosso estudo.

Sugere-se que os metais geram quantidades significativas de oxidantes, e que este aumento possa ter sido atenuado pela provável ingestão simultânea de grandes quantidades de vitamina C presentes na couve, levando à genotoxicidade e detecção dos danos através do ensaio

cometa de sangue agudo e crônico, mas não levando à formação de danos no córtex e no fígado no tratamento crônico, e não levando à mutagenicidade, portanto, não sendo visualizados danos no teste de micronúcleos.

Este e outros estudos realizados em genotoxicidade do carvão e seus derivados não puderam apontar para um único agente causal do dano genotóxico devido às interações biológicas e ambientais envolvidos. No entanto, os metais e pirita são alguns dos agentes identificados como a causa de danos observados (Cohn et al., 2006; Beyersmann e Hartwig 2008). Em nosso estudo, verificamos a presença de alguns elementos químicos, incluindo metais pesados, com maior concentração no grupo das hortaliças cultivadas na área de exploração de carvão do que no grupo das hortaliças proveniente do solo orgânico.

## 6 CONCLUSÃO

Atualmente a produção de alimentos e a qualidade ambiental são preocupações para os seres humanos, portanto uma melhor compreensão do comportamento dos elementos químicos no sistema solo-planta parece ser particularmente significativa. A acumulação excessiva de metais pesados em solos com resíduos de mineração de carvão, não só pode resultar na contaminação do solo, mas também afetam a qualidade e segurança dos alimentos.

Sabemos que vários elementos químicos quando estão presentes no solo acima de suas respectivas concentrações normais podem causar problemas de saúde humana através de seus efeitos tóxicos e genotóxicos. Como no Brasil, são escassos os dados disponíveis sobre os metais pesados, em cereais, frutas, plantas medicinais, carnes e nas hortaliças; este estudo apresenta os primeiros dados sobre os níveis de elementos químicos em hortaliças cultivadas em horta construída em áreas de exploração de carvão. Os nossos resultados servem de alerta, aos perigos quando pessoas comem alimentos provenientes de solos afetados pelas atividades de mineração de carvão.

Como as pessoas são encorajadas a consumirem mais vegetais e frutas, pois são fonte de vitaminas, minerais, fibras e trazem benefícios para a sua saúde, uma política pública deve regular pesquisas e programas de monitoramento de elementos químicos nos alimentos produzidos em áreas afetadas pela exploração de carvão, uma vez que estes vegetais contêm os metais essenciais e tóxicos ao longo de uma ampla gama de concentrações, que podem provocar mais danos que benefícios. .

Nosso estudo não definiu quais foram os contaminantes responsáveis pelos danos genéticos específicos na mineração de carvão, mas detectou efeitos genotóxicos em geral a partir de vários contaminantes, porque esta atividade antrópica é submetida a várias fontes de poluição ambiental.

Com isso concluímos que o presente estudo forneceu evidências de que o consumo de hortaliças cultivadas sobre área de exploração de carvão apresenta potencial genotóxico, podendo gerar um risco considerável à 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.

## **7 PERSPECTIVAS**

Pretendemos dar continuidade a este estudo, pois apresenta algumas limitações as quais sugerem que novas pesquisas sejam conduzidas para melhor elucidar os mecanismos moleculares e bioquímicos. Seria de grande importância complementar os dados mostrados nesta tese para uma melhor compreensão dos efeitos gerados pela exposição a resíduos de mineração de carvão, nos seguintes aspectos: incluir novos marcadores, para detecção de dano oxidativo no DNA, estresse oxidativo e de sinalização molecular em tecidos centrais e periféricos específicos.

## REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL). Carvão Mineral; 2008.
- Agostini JMS, Otto PA, 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. *Rev Bras Genet.* 1996; 19(4):641-46.
- Ajmone-Marsan F, Biasioli M. Trace elements in soil of urban areas. *Water, Air & Soil Pollution.* 2010; 213:121-143.
- Akinyele IO, Osibanjo O. Levels of some trace elements in hospital diets. *Food Chemistry.* 1982; 8: 247-251.
- Alam M, Snow E, Tanaka A. Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. *Science of The Total Environment.* 2003; 308:83-96.
- Allen SE. Chemical analysis of ecological materials. Oxford, Blackwell Scientific Publication.1989.
- Alexander P, Alloway B, Dourado A. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environmental Pollution.* 2006; 144:736-745.
- Alexandre NZ. Diagnóstico ambiental da região carbonífera de Santa Catarina: degradação dos recursos naturais. *Rev Tecnol Ambient.*1999; 5(2):35-53.
- Alloway BJ. Heavy metals in soils. New York: John Wiley & Sons; 1990.
- Amin NU, Hussain A, Alamzeb S, Begum S. Accumulation of heavy metals in edible parts of vegetables irrigated with waste water and their daily intake to adults and children, District Mardan, Pakistan. *Food Chem.* 2013; 136(3-4):1515-23.
- Andrade Júnior AS, Klar AE. Manejo da irrigação da cultura da alface (*Lactuca sativa L.*) através do tanque classe A. *Sci agric.* 1997; 54(1-2).

Andreo D, Jorge N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba. 2006; 24(2):319-336.

Apak R, Güçlü K, Demirata B, Ozyürek M, Celik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 2007; 12(7):1496-547.

Arora M, Kiran B, Rani S, Rani A, Kaur B, Mittal N. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. *Food Chemistry*. 2008; 111:811-815.

ATSDR. Toxicological profile for zinc. US Department of health and human services, Public.1994.

Azevedo FA, Chasin AAM. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: Rima, 2003. 340 p.

Ayaz FA, Hayırlıoğlu-Ayaz S, Alpay-Karaoğlu S, Grúz J, Valentová C, Ulrichová J, Strnad, M. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea L. var. acephala DC.*) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chem*. 2008; 107:19-25.

Bahemuka T, Mubofu E. Heavy metals in edible green vegetables grown along the sites of the Sinza and Msimbazi rivers in Dar es Salaam, Tanzania. *Food Chemistry*. 1999; 66:63-66.

Barroso MF, Silva A, Ramos S, Delerue-Matos MTOC, Sales MGF, Oliveira MBPP. Flavoured versus natural waters: Macromineral (Ca, Mg, K, Na) and micromineral (Fe, Cu, Zn) contents. *Food Chem*. 2009; 116(2):580-9.

Belolli M. História do carvão de Santa Catarina. Santa Catarina: Imprensa Oficial, 2002.

Berdanier, C. Advanced nutrition: Micronutrients. Boca Raton: CRC Press; 1998.

Bevilacqua HECCR. Classificação das hortaliças. In: Bevilacqua HECCR, editor. Cultivo de hortaliças. São Paulo: Bevilacqua; 2011. p.1-6.

Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 2008; 82(8):493-512.

Bhuiyan MA, Parvez L, Islam M, Dampare SB, Suzuki S. 2010. Heavy metal pollution of coal mine-affected agricultural soils in the northern part of Bangladesh. *Journal of Hazardous Materials.* 2010; 173:384-392.

Bilban M. Influence of the work environment in a Pb-Zn mine on the incidence of cytogenetic damage in miners. *American journal of industrial medicine.* 1998; 34: 455-463.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1):9-19.

Bissé E, Epting T, Beil A, Lindinger G, Lang H, Wieland H. Reference values for serum silicon in adults. *Anal Biochem.* 2005; 337(1):130-5.

Borba RF. Carvão Mineral. *Balanço Mineral Brasileiro.* Porto Alegre; 2001.

Borga K, Souza AV. Biomagnification of organochlorides along a batters sea food chain. *Environmental Pollution, London.* 2001; 113(2):123.

Brack W. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal Bioanal Chem.* 2003; 377(3):397-407.

Bradshaw E, McGlashan N, Fitzgerald D, Harington J. Analyses of cancer incidence in black gold miners from Southern Africa (1964-79). *British journal of cancer.* 1982; 46:737.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CONCEA Lei 11794, de 08/10/2008. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil.* Brasília.

BRASIL. Ministério. CONAMA. Resolução CONAMA n. 001, de 23 de janeiro de 1986. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil.* Brasília.

BRASIL. Ministério. CONAMA. Resolução CONAMA n. 420, 23 de dezembro de 2009. "Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas". Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília.

Brooks RR. Biological methods of prospecting for minerals. New York: Willey-Interscience; 1983.

Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Piłat-Marcinkiewicz B, Sawicki B. Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol*. 2003; 38(1):2-10.

Bunz K, Trautmannsheimer M, Schramel P, Reifenhäuser W. Availability of arsenic, copper, lead, thallium, and zinc to various vegetables grown in slag-contaminated soils. *J Environ Qual*. 2001; 30(3):934-9. by enzymatically generated free radicals. In vivo study. *Microvasc Res*. 1981; 22(3):239-54.

Burnell JN. The biochemistry of manganese in plants. In: Graham RD, Hannam RJ, Uren NC. (Ed.). *Manganese in soils and plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1988; 125-137.

Camargo O, Moniz A, Jorge J, Valadares J. Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, Instituto Agronômico. Boletim técnico. 2009; 106:77.

Campbell JL, Hopman TL, Maxwell JA, Nejedly Z. The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database. *Nucl Instr Meth Phys Res*. 2000; 170(1-2):193-204.

Campos ML, Almeida JA, Silveira CB, Gatiboni LC, Albuquerque JA, Mafra AL, Miquelluti DJ, Filho OK, Santos JCP. Soil impacts caused by coal mining and coal mine waste. *Rev Cienc Agrov*. 2010; 9(2):198-205.

Campos ML, Almeida JA, Souza LS. Avaliação de três áreas de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Müller, Santa Catarina. *Rev Bras Cienc Solo*. 2003; 27(3):1123-37.

Cardoso EJBN, Navarro RB, Nogueira MA. Absorção e translocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob doses crescentes deste nutriente. *Rev Bras Cienc Solo*. 2003; 27(3):415-23.

Cardoza V, Stewart Jr. Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 2004; 40(6): 542-55.

Carvalho, HDRT. Avaliação socioeconômica e ambiental em uma área impactada pela extração do carvão: estudo de caso no bairro Colonial em Criciúma-SC [Dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2008.

Celik M, Donbak L, Unal F, Yüzbasioglu D, Aksoy H, Yilmaz S. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutat Res*. 2007; 627(2):158-63.

Centro de Tecnologia Mineral (CETEM). Projeto conceitual para recuperação ambiental da Bacia Carbonífera Sul Catarinense. Relatório Técnico elaborado para o SIECESC; 2001.

Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*. 2006; 88(11):1707-19.

Chary NS, Kamala CT.; Raj DSS. Assessing risk of heavy metals from consuming food grown on sewage irrigated soils and food chain transfer. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York.2008; 69:513-524.

Codex Alimentarius Commission. Contaminants, Joint FAO/WHO Food Standards Program, Vol. XVII 1<sup>st</sup> ed. Codex Alimentarius.1984

Cohn CA, Mueller S, Wimmer E, Leifer N, Greenbaum S, Strongin DR, Schoonen MAA. Pyrite-induced hydroxyl radical formation and its effect on nucleic acids. *Geochem Trans*. 2006; 3:1-11

Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30(2):139-46.

Collins AR. Oxidative DNA damage, antioxidants, and câncer. *Bioessays*. 1999; 21(3):238-46.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003; 17(10):1195-214.

Cortez LAB, Honório SL, Neves Filho LC, Moretti CL. Importância do resfriamento para frutas e hortaliças no Brasil. In: Cortez LAB, Honório SL, Moretti CL. Resfriamento de frutas e hortaliças. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2002. 17-35.

Costa S, Zocche JJ, Zocche-de-souza P. Absorção de metais pesados (Zn e Pb) por *Axonopus obtusifolius* (Radi) em áreas degradadas pela mineração de carvão, SC, Brasil. *Rev Bras Biociênc*. 2007; 5:765-67.

Costa S, Zocche JJ. Fertilidade de solos em áreas de mineração de carvão na região sul de Santa Catarina. *Rev Árvore (Impr)*. 2009; 33:665-74.

D'amato C, Torres JPM, Malm O. DDT (Dicloro Dofenil Tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Química Nova*, São Paulo. 2002; 25(6):995-1002.

Daniels WL, Stewart B, Dove D. 1995. Reclamation of coal refuse disposal areas. *Va. Coop. Ext. Pub*. 1995; 460:131.

Da Silva J, de Freitas TR, Heuser V, Marinho JR, Erdtmann B. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen*. 2000a; 35(4):270-8.

Da Silva J, de Freitas TR, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. An alkylene single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biol*. 2000b; 2(1):241-5.

Da Silva Souza T, Fontanetti CS. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat Res*. 2006; 605(1-2):87-93.

Da Silveira FZ, Defaveri TM, Ricken C, Zocche JJ, Pich CT. Toxicity and genotoxicity evaluation of acid mine drainage treatment using *Artemia* sp. and *Geophagus brasiliensis* as bioindicators. In: Barnhisel RI, editor. National Meeting of the American Society of Mining and Reclamation, Billings, MT Revitalizing the Environment: Proven Solutions and Innovative Approaches. Lexington: ASMR; 2009. p. 1725-42.

Defaveri TM, Silveira FZ, Ricken C, Zocche JJ, Pich CT. Evaluation of acid mine drainage treatment using *Artemia* sp. and *Allium cepa* as bioindicators of toxicity and genotoxicity. In: Barnhisel RI editor. National Meeting of the American Society of Mining and Reclamation, Billings, MT Revitalizing the Environment: Proven Solutions and Innovative Approaches. Lexington: ASMR; 2009. p. 283-301.

D'mello JF. Food safety: contaminants and toxins. CABI.2003.

Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). Informe Mineral: Desenvolvimento & Economia mineral; 2008.

Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). Informe Mineral: Desenvolvimento & Economia mineral. Brasília: Ed. Abril; 2004.

Dinardi AL, Formagi VM, Coneglian CMR, Brito NN, Sobrinho GD, Tonso S, Pelegrini R. Fitorremediação. Unicamp. São Paulo; 2000.

Dogheim S, Ashraf EM, Alla SG, Khorshid M, Fahmy S. Pesticides and heavy metals levels in Egyptian leafy vegetables and some aromatic medicinal plants. Food additives and contaminants. 2004; 21:323-330.

Donbak L, Rencuzogullari E, Yavuz A, Topaktas M. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. Mutat Res. 2005; 588(2):82-7.

Eagon PK, Teepe AG, Elm MS, Tadic SD, Epley MJ, Beiler BE, Shinozuka H, Rao KN. Hepatic hyperplasia and cancer in rats: alterations in copper metabolism. Carcinogenesis. 1999; 20:1091-1096.

Ebina Y, Okada S, Hamazaki S, Midorikawa O. Liver, kidney, and central nervous system toxicity of aluminum given intraperitoneally to

rats: a multiple-dose subchronic study using aluminum nitritotriacetate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984; 75(2):211-8.

El Hamiani O, El Khalil H, Lounate K, Sirguy C, Hafidi M, Bitton G, Schwartz C, Boularbah A. Toxicity assessment of garden soils in the vicinity of mining areas in Southern Morocco. *J Hazard Mater.* 2010; 177(1-3):755-61.

El-Khamisy SF, Caldecott KW. TDP1-dependent DNA single-strand break repair and neurodegeneration. *Mutagenesis.* 2006; 21(4):219-24.

Fagundes GE. Influência de sucos de hortaliças fonte de luteína e beta-caroteno sobre a genotoxicidade induzida por agentes alquilantes em camundongos [Dissertação de mestrado]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2012.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995; 339(1):37-59.

Favas PC. Biogeoquímica em áreas mineiras estano-volframíticas. Tese para a obtenção do grau de Doutor. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 2008; 805 p.

Feig DI, Reid TM, Loeb LA. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Research.* 1994; 54:1890s-1894s.

Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J, Sandrini JZ, Amado LL, Geracitano LA, Rebelo M, Bianchini A, Monserrat JM. Antioxidant responses in different body regions of the *polychaeta Laeonereis acuta* (Nereididae) exposed to copper. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009; 72(2):388-93.

Ferreira MD, Tivelli S W. Cultura da beterraba: Recomendações gerais. 3.ed. Guaxupé: Cooxupé. Boletim Técnico Olericultura. 1990; 2:14.

Filgueira FAR. Brassicáceas-couves e plantas relacionadas. In: Filgueira FAR, editor. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ª ed. Viçosa: UFV; 2008. p.421.

Filgueira FAR. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV; 2000. p. 402.

Fior, Rafael Carvalho. Monitoramento ambiental de zinco em produtos. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo Piracicaba, 2012. 72 p.

Franco C. Tabela de composição química dos alimentos. 8ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987.

Franz E, Romkens P, Van Raamsdonk L, Van Der Fels-Klerx I. A chain modeling approach to estimate the impact of soil cadmium pollution on human dietary exposure. *Journal of Food Protection*. 2008; 71:2504-2513.

Freitas M, Zocche JJ, Essemam QK. Metais pesados (Mn e Zn) em *Typha domingensis* Pers. em áreas de mineração de carvão. *Rev Bras Biociênc*. 2007; 5:789-67.

Gaivizzo LB, Vidor C, Tedesco MJ, Bissani CA. Potencial poluidor de rejeitos carboníferos. II – efeitos da recuperação com camadas de solo sobre as plantas e a população microbiana. *Cienc*. 2002; 32(6):955-61.

Galaris D, Evangelou A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002; 42(1):93-103.

Gerber B, Müller H, Reimer T, Krause A, Friese K. Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 79(2):265-76.

Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 213(3):282-90.

Giri U, Iqbal M, Athar M. 1999. Copper-nitritotriacetate (Cu-NTA) is a potent inducer of proliferative response both in liver and kidney but is a complete renal carcinogen. *International journal of oncology*. 1999; 14:799-1605.

Goldschmidt VM. Rare elements in coal ash. J Ind Eng Chem. 1930; 27(9):1100-03.

Gomes AP, Ferreira JAF, Albuquerque LF, Süffert T. Carvão fóssil. Estud. Av. 1998; 12(33):89-106.

Gonçalves ÁL, Lemos M, Niero R, de Andrade SF, Maistro EL. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea L. var. acephala D.C.* in different cells of mice. J Ethnopharmacol. 2012; 143(2):740-745.

Gonzalez-Fernandez O, Batista MJ, Abreu MM, Queralt I, Carvalho ML. Elemental characterization of edible plants and soils in an abandoned mining region: assessment of environmental risk. X-ray spectrom. 2011; 40(5):353-63.

Goodman WG. Calcium and phosphorus metabolism in patients who have chronic kidney disease. Med Clin North Am. 2005; 89(3):631-47.

Guo L, Yang JY, Wu CF. Oxidative DNA damage induced by ethanol in mouse peripheral leucocytes. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008; 103:222-27.

Gussarsson M, Adalsteinsson PJ, Asp H. Cadmium and copper interactions on the accumulation and distribution of Cd and Cu in birch (*Betula pendula Roth*) seedlings. Plant and Soil. 1995; 171:185-87.

Hamerski L, Rezende MJC, Silva BV. Usando as Cores da Natureza para Atender aos Desejos do Consumidor: Substâncias Naturais como Corantes na Indústria Alimentícia. Rev Virtual Quim. 2013; 5(3):394-420.

Hansen PE, Jørgensen SE. Introduction to environmental management. Elsevier Science Publishers. 1991.

Harbaum B, Hubbermann EM, Zhu Z, Schwarz K. Free and bound phenolic compounds in leaves of pak choi (*Brassica campestris L. ssp. chinensis var. communis*) and chinese leaf mustard (*Brassica juncea Coss*). Food Chemistry. 2008; 110(4): 838-846.

Harmanescu M, Alda LM, Bordean DM, Gogoasa I, Gergen I. Heavy metals health risk assessment for population via consumption of vegetables grown in old mining area; a case study: Banat County, Romania. *Chem Cent J*. 2011; 5:64.

Hashimoto K, Takasaki W, Sato I, Tsuda S. DNA damage measured by comet assay and 8-OH-dG formation related to blood chemical analyses in aged rats. *J Toxicol Sci*. 2007; 32(3):249-59.

He F, Buoso MC, Burattini E, Fazinic S, Galassini S, Haque AMI, Jaksic M, Moschini G. Target preparation for trace element determination of biological materials using techniques *Nucl Instr Meth Phys Res*. 1993; 334(1):238-45.

Hendriks AJ, Ma WC, Brouns JJ, de Ruiter-Dijkman EM, Gast R. Modelling and monitoring organochlorine and heavy metal accumulation in soils, earthworms, and shrews in Rhine-delta floodplains. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1995; 29(1):115-27.

Henkler F, Brinkmann J, Luch A. The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers (Basel)*. 2010; 2(2):376-96.

Horbach R, Kuck L, Marimon RG, Moreira MLD, Marimon MPC, Pires JL, Vivian D, Marinho D, Teixeira W. *Geologia*. In: Levantamento de recursos naturais. 33<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: IBGE; 1986. p. 29-312.

Hursting SD, Berger NA. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *J Clin Oncol*. 2010; 28(26):4058-65.

Hussein L, Bruggeman J. Zinc analysis of Egyptian foods and estimated daily intakes among an urban population group. *Food Chemistry*. 1997; 58:391-398.

Jackson M. Selenium: geochemical distribution and associations with human heart and cancer death rates and longevity in China and the United States, Selenium. Springer. 1988; 13-21.

Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*. 2003; 68:167-182.

Johansson SA, Campbell JL, Malmqvist KG. Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE). 1<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley and Sons; 1995.

Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011; 283(2-3):65-87.

Jordão CP, Fialho LL, Cecon PR, Matos AT, Neves JCL, Mendonça ES, Fontes RLF. Effects of Cu, Ni and Zn on Lettuce Grown in Metal-Enriched Vermicompost Amended Soil. *Water Air Soil Pollut*. 2006; 172:21-38.

Júnior TJP, Verzon M. 101 culturas: manual de tecnologias agrícolas. 1<sup>a</sup> ed. Belo horizonte: Epamig; 2007.

Kabata-Pendias A. Trace elements in soils and plants. CRC press.2010.

Kalloor G. Kale: *Brassica oleracea L. var. acephala*. *Food Chem*. 2008; 108(2):642-48.

Kan CA, Meijer GAL. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Anim feed sci tech*. 2007; 133(1-2):84-108.

Kanner J, Harel S, Granit R. Betalains--a new class of dietary cationized antioxidants. *J Agric Food Chem*. 2001; 49(11):5178-85.

Khan S, Cao Q, Zheng YM, Huang YZ, Zhu YG. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environ Pollut*. 2008; 152(3):686-92.

Kido R, Sato I, Tsuda S. Detection of in vivo DNA damage induce by ethanol in multiple organs of pregnant mice using the alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *J Vet Med Sci*. 2006; 68:41-47.

Kim GH. Determination of Vitamin U in food plants. *Food Sci Technol Res*. 2003; 9(4):316-19.

Korus A, Lisiewska Z. Effect of preliminary processing and method of preservation on the content of selected antioxidative compounds in kale (*Brassica oleracea L. var. acephala*) leaves. *Food Chem*. 2011; 129(1):149-54.

Korus A. Effect of preliminary processing, method of drying and storage temperature on the level of antioxidants in kale (*Brassica oleracea L. var. acephala*) leaves. LWT-Food Sci Technol. 2011; 44(8):1711-16.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutat Res. 2000; 455(1-2):155-66.

Kuzmick DM, Mitchelmore CL, Hopkins WA, Rowe CL. Effects of coal combustion residues on survival, antioxidant potential, and genotoxicity resulting from full-lifecycle exposure of grass shrimp (*Palaemonetes pugio Holthius*). Sci Total Environ. 2007; 373(1):420-30.

Laus R, Laranjeira MCM, Martins AO, Fávère VT, Pedrosa RC, Benasi JC, Geremias R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. Quím Nova. 2006; 29(1):34-9.

Leffa DD, Damiani AP, da Silva J, Zocche JJ, dos Santos CE, Bouffleur LA, Dias JF, de Andrade VM. Evaluation of the genotoxic potential of the mineral coal tailings through the *Helix aspersa* (Müller, 1774). Arch Environ Contam Toxicol. 2010; 59(4):614-21.

Leffa DD, Santos CEI, Debastiani R, Amaral L, Yoneama ML, Dias JF, Andrade VM. Elemental concentrations in kidney and liver of mice fed with cafeteria or standard diet determined by Particle Induced X-ray. Nucl Instrum Meth B. 2014; 318:198-201.

Lefsrud MG, Kopsell DA, Kopsell DE, Randle WM. Kale carotenoids are unaffected by, whereas biomass production, elemental concentrations, and selenium accumulation respond to, changes in selenium fertility. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006; 54(5):1764-1771.

Leite JCL, Schüler-faccini L. Defeitos congênitos em uma região de mineração de carvão. Rev Saúde Pública. 2001; 35(2):136-41.

León G, Pérez LE, Linares JC, Hartmann A, Quintana M. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat Res.* 2007; 630(1-2):42-9.

León-Mejía G, Espitia-Pérez L, Hoyos-Giraldo LS, Da Silva J, Hartmann A, Henriques JA, Quintana M. Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Sci Total Environ.* 2011; 409(4):686-91.

Lim H, Lee J, Chon H, Sager M. Heavy metal contamination and health risk assessment in the vicinity of the abandoned Songcheon Au–Ag mine in Korea. *J Geochem Explor.* 2008; 96(2-3):223-30.

Lima CB, Bellettini NMT, Silva AS, Cheirubim AP, Janani JK, Vieira MAV, Amador TS. Uso de plantas medicinais pela população da zona urbana de Bandeirantes-PR. *Rev bras biocienc.* 2007; 5(Supl.1):600-2.

Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *The American journal of clinical nutrition.* 1996; 63:797S-811S.

Lisiewska Z, Kmiecik W, Korus A. The amino acid composition of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), fresh and after culinary and technological processing. *Food Chem.* 2008; 108:642-48.

Liu G, Vassilev SV, Gao L, Zheng L, Peng Z. Mineral and chemical composition and some trace element contents in coals and coal ashes from huaibei coal field, china. *Energ convers manage.* 2005a; 46(13-14):2001-9.

Liu H, Probst A, Liao B. Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzhou lead/zinc mine spill (Hunan, China). *Sci Total Environ.* 2005b; 339(1-3):153-66.

Lobo JC, Torres JP, Fouque D, Mafra D. Zinc deficiency in chronic kidney disease: is there a relationship with adipose tissue and atherosclerosis? *Biol Trace Elem Res.* 2010; 135(1-3):16-21.

Lopes A. Avaliação do risco de contaminação ambiental utilizando como bioindicador o ratinho-caseiro (*Mus Musculus*) [Dissertação de

Mestrado]. Departamento de biologia animal. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências; 2009.

Luo X, Yu S, Zhu Y, Li X. Trace metal contamination in urban soils of China. *Science of the Total Environment*. 2011; 421(422):17-30.

Maçaneiro KC. Efeito da calagem e da adubação orgânica no estabelecimento de gramíneas em áreas de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Müller, Santa Catarina [Dissertação de Mestrado]. Florianópolis: Universidade do Estado de Santa Catarina; 2001.

McGrath S, Zhao J, Lombi E. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy*. 2002; 75:1-56.

Malavolta E. Manual de química agrícola: nutrição de plantas e fertilidade do solo, Manual de química agrícola: nutrição de plantas e fertilidade do solo. *Agrônômica Ceres*. 1976.

Mapanda F, Mangwayana E, Nyamangara J, Giller K. The effect of long-term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2005; 107:151-165.

Mapanda F, Mangwayana EM, Nyamangara J, Giller KE. (2007). Uptake of heavy metals by vegetables irrigated using wastewater and the subsequent risks in Harare, Zimbabwe. *Physics and Chemistry of the Earth*. 2007; 32:1399–1405.

Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tetè S, Baldini A, Tecco S, Marzo G. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)*. 2012; 9(1):88.

Marschner H, Marschner P. Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic press. 2012

Martins AA. Sócio-economia do carvão em Santa Catarina: uma contribuição ao estudo de sua trajetória [Dissertação de mestrado]. Programa de Pós-graduação em Economia. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.

Matsui S. Diretrizes para o gerenciamento de lagos: gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios. São Carlos: International Institute of Ecology, 2002. 216 p.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1990; 239(1):29-80.

Mayer M. Report IPP 9/113, Max-Planck-Institut fur Plasmaphysik. Germany: Garching; 1977.

Menezes AP, Da Silva J, Roloff J, Reyes J, Debastiani R, Dias JF, Rohr P, de Barros Falcão Ferraz A. *Baccharis trimera (Less.) DC* as genotoxicity indicator of exposure to coal and emissions from a thermal power plant. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2013; 65(3):434-41.

Mestek O, Polak J, Juricek M, Karvankova P, Koplík R, Šantrucek J, Kodicek M. Trace element distribution and species fractionation in *Brassica napus* plant. *Applied Organometallic Chemistry*, 2007; 21(6):468-474.

Miadoková E, Dúhová V, Vlcková V, Sládková L, Sucha V, Vlcek D. Genetic risk assessment of acid waste water containing heavy metals. *Gen Physiol Biophys.* 1999; 18:92-8.

Milioli G, Santos R, Zanette VC. Mineração de carvão, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no sul de Santa Catarina. Curitiba: Juruá; 2009.

Milman N, Laursen J, Byg KE, Pedersen HS, Mulvad G. Rubidium content in autopsy liver tissue samples from Greenlandic Inuit and Danes measured by X-ray fluorescence spectrometry. *J Trace Elem Med Biol.* 2006; 20(4):227-32.

Miron A, Hancianu M, Aprotosoiaie AC, Gacea O, Stanescu U. Contributions to chemical study of the raw polysaccharide isolated from the fresh pressed juice of white cabbage leaves. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2006; 110(4):1020-6.

Moïse JÁ, Han S, Gudynaite-Savitch L, Johnson DA, Miki BL. A. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*.2005; 41(5):620-644.

Monteiro KV. Carvão: o combustível de ontem. Porto Alegre: Núcleo Amigos da Terra Brasil; 2004. p.80.

Moreira RCT, Costa LCB, Costa RCS, Rocha EA. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. *Acta Farm Bonaerense*. 2002; 21(3):205-11.

Müller AA, Santos HM, Schmitt JCC, Maciel LAC, Bertol MA, César SB. Perfil analítico do carvão. 2ª ed. Porto Alegre: DNPM; 1987. p.140.

Nakajima T, Hasegawa H, Nakamata S, Takanashi H, Ohki A. Mutagenicity of eluent by hot water extraction of various coals: Effect of chlorination. *Fuel*. 2008; 87(13-14):3132-36.

Nie ZJ, Hu CX, Sun XC, Tan QL, Liu HE. Effects of molybdenum on ascorbate-glutathione cycle metabolism in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant and Soil*.2007; 295(1-2):13-21.

Olabanji SO, Omobuwajo OR, Ceccato D, Adebajo AC, Buoso MC, Moschini G. Accelerator-based analytical technique in the study of some anti diabetic medicinal plants of Nigeria. *Nucl Instr Meth Phys Research B*. 2008; 266(10):2387–90.

Onyedika GO, Nwosu GU. Lead, zinc and cadmium in root crops from mineralized galena-sphalerite mining areas and environment. *Pak J Nutr*. 2008; 7:418-420.

Ornelas HL. Técnica Dietética: seleção e preparo de alimentos. 8ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p.158-64.

Onianwa P, Adeyemo A, Idowu O, Ogabiela E. Copper and zinc contents of Nigerian foods and estimates of the adult dietary intakes. *Food Chemistry*. 2001; 72:89-95.

O'Shea TJ, Everette AL, Ellison LE. Cyclodiene insecticide, DDE, DDT, arsenic, and mercury contamination of big brown bats (*Eptesicus*

fuscus) foraging at a Colorado Superfund site. Arch Environ Contam Toxicol. 2001; 40(1):112-20.

Padilha PC, Pinheiro RL. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. Rev bras cancerol. 2004; 50(3):251-60.

Paraíba LC, Carlaboeira R, Jonsson CM, Carrasco JM. Fator de bioconcentração de poluentes orgânicos de lodos em frutos de laranjeiras. Pesticidas: R ecotox meio ambiente. 2006; 16:125-134.

Pascallicchio AE. Contaminação por Metais Pesados: Saúde Pública e Medicina Ortomolecular. São Paulo: Anna Blume; 2002.

Pedroche J, Yust MM, Lqari H, Girón-Calle J, Alaiz M, Vioque J, Millán F. Brassica carinata protein isolates: chemical composition protein characterization and improvement of functional properties. Food Chem. 2004; 88(3):337-46.

Peeters EG. The possible influence of the components of the soil and the lithosphere on the development and growth of neoplasms. Experientia. 1987; 43:74-81.

Peña, RL, Hughes J. Improving vegetable productivity in a variable and changing climate. SAT e Journal. 2007; 4(1):2.

Peruch LAM; Michereff SJ; Araújo IB. Levantamento da intensidade da alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. Horticultura Brasileira. 2006; 24(4):464-9.

Philippi ST. Nutrição e dietética. 2ª ed. Barueri: Manole; 2006.

Pinto RSBFF. Hortas Urbanas: Espaços para o desenvolvimento Sustentável Urbano [Dissertação de mestrado]. Mestrado em Engenharia Municipal, Área de Especialização em Planejamento Urbanístico. Cidade de Braga: Universidade do Minho; 2007.

Prá D, Guecheva T, Franke SIR, Knakievicz T, Erdtmann B, Henriques JAP. Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos. J Braz Soc Ecotoxicol. 2006; 1(2):171-75.

Prentice A. Does mild zinc deficiency contribute to poor growth performance? *Nutrition reviews*. 1993; 51:268-270.

Press F. *Para entender a terra*. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman; 2006.

Pruvot C, Douay F, Hervé F, Waterlot C. Heavy Metals in Soil, Crops and Grass as a Source of Human Exposure in the Former Mining Areas. *J Soils Sediments*. 2006; 6(4):215-20.

Radwan MA, Salama AK. Market basket survey for some heavy metals in Egyptian fruits and vegetables. *Food and chemical Toxicology*. 2006; 44:1273-1278.

Rashid MA, Singh DP. *A manual on vegetable seed production in Bangladesh*. AVRDC-USAID-Bangladesh project horticulture research centre Bangladesh agricultural research institute joydebpur, 2000. Gazipur.

Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. A Importância da Mutagênese Ambiental na Carcinogênese Humana. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ed. Ulbra; 2003. p. 21-7.

Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, Kidlington. 2005; 92 (2):235-254.

Rohr P, Kvitko K, da Silva FR, Menezes AP, Porto C, Sarmiento M, Decker N, Reyes JM, Allgayer Mda C, Furtado TC, Salvador M, Branco C, da Silva J. Genetic and oxidative damage of peripheral blood lymphocytes in workers with occupational exposure to coal. *Mutat Res*. 2013; 758(1-2):23-8.

Rusafa A, Navaro S, Barba A, Marcos C, Cãmara MA, Salas F. Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food web in the mar menor Lagoon (Se Spain). *Marine Pollution Buletin*, London. 2000; 40(2):140-151.

Sadhu K, Adhikari K, Gangopadhyay A. Effect of mine spoil on native soil of Lower Gondwana coal fields: Raniganj coal mines areas, India. *International Journal of Environmental Sciences*. 2012; 2: 1675-1687.

Sampaio R A, Guivara L, Fernandes L A, Costa C A, Guilherme D O. Produção e concentração de metais pesados em plantas de beterraba adubadas com composto de lixo urbano. *Caatinga*.2008; 21: 83-88.

Sampaio CH. Beneficiamento do carvão. In: FEPAM, editor. Meio ambiente e carvão. Porto Alegre: Fepam; 2002.

Sanchez JCD, Formoso MLL. Utilização do carvão e meio ambiente. Porto Alegre: Cientec; 1990.p. 34.

Sánchez-Chardi A, Marques CC, Gabriel SI, Capela-Silva F, Cabrita AS, López-Fuster MJ, Nadal J, Mathias ML. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. *Environ Pollut*. 2008; 156(3):1332-9.

Santa Maria SR, Arana M, Ramirez O. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from male native miners working in the Peruvian Andes. *Genet Mol Biol*. 2007; 30(4):1135-38.

Santos IC, Casali VWD, Miranda GV. Heavy metals, K and Na contents in substrate in function of doses of organic compost of urban waste and lettuce cultivars. *Cienc*. 1999; 29(3):415-21.

Santos MAT; Abreu CMP; Carvalho VD. Efeito de diferentes tempos de cozimento nos teores de minerais em folhas de brócolis, couve-flor e couve. *Cienc agrotec*. 2003; 27(3):597-604.

Santos MRA, Lima MR. Levantamento dos recursos vegetais utilizados como fitoterápicos no município de Cujubim, Rondônia, Brasil. *Saber científico*. 2008; 01:58-74.

Sathawara N, Parikh D, Agarwal Y. Essential heavy metals in environmental samples from western India. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2004; 73:756-761.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Hortaliças minimamente processadas: estudos de mercado SEBRAE/ESPM. Rio de Janeiro; 2008.

Segovia JFO, Andriolo JL, Buriol GA, Schneider FM. Comparação do crescimento e desenvolvimento da alface (*Lactuca sativa* L.) No interior e no exterior de uma estufa de polietileno em Santa Maria, RS. *Cienc.*1997; 27(1):37-41.

Silva EC, Fregoneze J. Efeitos de metais pesados sobre o controle central do equilíbrio hidroeletrólítico. *Rev Cien Méd Biol.* 2002; 1(1):116-23.

Silva LF, Oliveira ML, da Boit KM, Finkelman RB. Characterization of Santa Catarina (Brazil) coal with respect to human health and environmental concerns. *Environ Geochem Health.* 2009; 31(4):475-85.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175(1):184-91.

Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(9):712-21.

Siwińska E, Mielżyńska D, Kapka L. Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in coke oven workers. *Occup Environ Med.* 2004; 61(3):10.

Smolin L, Grosvenor M. *Nutrition: Science and applications.* 3<sup>a</sup> ed. Orlando: Harcourt College Publishers; 2000.

Soares CRFS, Accioly AMA, Marques TCLLSM, Siqueira JO, Moreira FMS. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *Rev Bras Fisiol Veg.* 2001; 13(3):302-15.

Soares ER, Mello JV, Schaefer CEGR, Costa LM. Cinza e carbonato de cálcio na mitigação de drenagem ácida em estéril de mineração de carvão. *Rev Bras Ciênc Solo.* 2006; 30(1):171-181.

Srám RJ, Holá N, Kotěšovec F, Vávra R. Chromosomal abnormalities in soft coal open-cast mining workers. *Mutat Res.* 1985; 144(4):271-5.

Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(2):321-36.

Szeto YT, Kwok TC, Benzie IF. Effects of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk. *Nutrition, New York*, 2004; 20(10):863-866.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3):206-21.

Trichopoulos D, Lipworth L, Petridou E, Adami HO. Epidemiology of cancer. *Cancer, principles and practice of oncology.* Lippincott Company, Philadelphia. 1997; 231.

Tivelli SW, Trani PE. Hortaliças: Beterraba (*Beta vulgaris* L.). 2008.

Turconi G, Minoia C, Ronchi A, Roggi C. Dietary exposure estimates of twenty-one trace elements from a Total Diet Study carried out in Pavia, Northern Italy. *Br J Nutr.* 2009; 101(8):1200-8.

Türkdoğan MK, Kilicel F, Kara K, Tuncer I, Uygan I. Heavy metals in soil, vegetables and fruits in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2003; 13:175-179.

Valerio ME, García JF, Peinado FM. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci Total Environ.* 2007; 378(1-2):63-6.

Villatoro-Pulido M, Font R, De Haro-Bravo MI, Romero-Jiménez M, Anter J, De Haro Bailón A, Alonso-Moraga A, Del Río-Celestino M. Modulation of genotoxicity and cytotoxicity by radish grown in metal-contaminated soils. *Mutagenesis.* 2009; 24(1):51-7.

Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond).* 2006; 30(3):400-18.

Vrščaj B, Poggio L, Ajmone Marsan F. A method for soil environmental quality evaluation for management and planning in urban areas. *Landscape and Urban Planning*. 2008; 88:81–94.

Walker LA, Bailey LJ, Shore RF. The importance of the gut and its contents in prey as a source of cadmium to predators. *Environ Toxicol Chem*. 2002; 21(1):76-80.

Wang J, Liu W, Yang R, Zhang L, Ma J. Assessment of the potential ecological risk of heavy metals in reclaimed soils at an opencast coal mine. *DISASTER ADVANCES*. 2013; 6:366-377.

Wilberforce OJO, Nwabue FI. Heavy Metals Effect due to Contamination of Vegetables from Enyigba Lead Mine in Ebonyi State, Nigeria. *Environ Pollut*. 2013; 2(1).

Wildman REC, Medeiros DM. *Advanced human nutrition*. 2<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC Press; 2000.

Wu F, Liu Y, Xia Y, Shen Z, Chen, Y. Copper contamination of soils and vegetables in the vicinity of Jiuhuashan copper mine, China. *Environ Earth Sci*; 2011; 64:761-69.

Yang-Xian, Chen-Xiaoyan, Liu-Zhikai, Yang-X, Chen-Xy, Liu-Zc. Effects of boron and molybdenum nutrition on curd yield and active oxygen metabolism in broccoli (*Brassica oleracea var. italica*). *Acta Horticulturae Sinica*. 2000; 27(2):112-116.

Zaidi MI, Asrar A, Mansoor A, Farooqui M. The heavy metal concentration along roadside trees of Quetta and its effects on public health. *Journal of Applied Sciences*. 2005; 5:708-711.

Zheljzakov, VD, Jeliakova EA, Kovacheva N, Dzhurmanski A. Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter. *Environmental and experimental botany*. 2008; 64: 207-216.

Zhuang P, McBride MB, Xia H, Li N, Li Z. Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of Dabaoshan mine, South China. *Sci Total Environ*. 2009; 407(5):1551-61.

Zocche JJ, da Silva LA, Damiani AP, Mendonça RÁ, Peres PB, dos Santos CE, Debastiani R, Dias JF, de Andrade VM, Pinho RA. Heavy-metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*: the impact of coal-mining pollutants on amphibians. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2014; 66(1):69-77. P79

Zocche JJ, Damiani AP, Hainzenreder G, Mendonça RÁ, Peres PB, Santos CE, Debastiani R, Dias JF, Andrade VM. Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013; 36(1):194-201.

Zocche JJ, Freitas M, Quadros KE. Concentração de Zn e Mn nos efluentes do beneficiamento de carvão mineral e em *Typha domingensis* PERS (Typhaceae). *Rev Árvore (Impr.)*. 2010a; 34(1):1077-88.

Zocche JJ, Leffa DD, Damiani AP, Carvalho F, Mendonca RA, dos Santos CE, Bouffleur LA, Dias JF, de Andrade VM. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. *Environ Res*. 2010b; 110(7):684-91.

Zocche-de-souza P, Costa S, Zocche JJ. *Baccharis trimera* Less. DC. como indicadora da recuperação de áreas mineradas de carvão. *Rev bras biociênc*. 2007; 5:702-04.

Zurera-Cosano G, Moreno-Rojas R, Salmeron-Egea J, Lora RP. Heavy metal uptake from greenhouse border soils for edible vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1989; 49:307-314.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1- Carta de Aprovação da CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



### Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 110/2011

Professor:

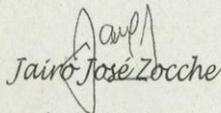
VANESSA MORAES DE ANDRADE

**Título: "METAIS PESADOS EM HORTALIÇAS CULTIVADAS EM ÁREAS DE EXPLOTAÇÃO DE CARVÃO: POTENCIAL MUTAGÊNICO E RISCOS À SAÚDE HUMANA".**

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA.

[www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua)

Criciúma, 20 de dezembro de 2011.

  
Jairo José Zocche

Coordenador do CEUA

## ANEXO 2- Certificado do produtor

1918BR1200Z1p(BR)



## CERTIFICADO DE CONFORMIDADE

PARA PRODUTOS DA AGRICULTURA ORGÂNICA DESTINADOS AO MERCADO INTERNO BRASILEIRO

A ECOCERT BRASIL Certificadora Ltda., organismo de certificação de produtos acreditado pela Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO - CGCRE sob o nº 0077 e credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o nº 002; certifica que os produtos listados abaixo e comercializados sob responsabilidade do operador:

### Pedro Alcino Budny

**Rod. ICR 356, Espigão**  
**88820-000 Içara/SC**

são produzidos, processados e/ou comercializados conforme as regras determinadas pela Lei 10.831/03, Decretos 6323/07 e 7048/09, IN 19/09, IN 50/09 e demais Instruções Normativas correspondentes. O operador concordou com estas regras e submeteu as unidades pertinentes às normas de inspeção previstas na referida lei e sua regulamentação. *Este certificado não substitui a Declaração de Transação Comercial. Este documento é propriedade da ECOCERT BRASIL e deve ser devolvido mediante solicitação. Somente o original é válido.*

Data da última inspeção: 08/06/2012

Local de produção	Comercializador	Ano da colheita
Pedro Alcino Budny 88820-000 Içara/SC	Pedro Alcino Budny 88820-000 Içara/SC	2012/2013

Produtos comerciais	Categoria de certificação	Quantidade estimada (toneladas)
Hortaliças*	Produto orgânico - IN 46/11	71,00
Morango	Produto orgânico - IN 46/11	33,00

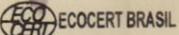
\* Hortaliças: alface, alface americana, abóbora, abobrinha, alpin, batata doce, beterraba, cenoura, couve folha, couve flor, couve brócolis, feijão vagem, pimentão, pimenta, pepino, rúcula, repolho, tomate cereja, tomate salada, tempero (cebolinha e salsa).

Certificado nº  
1918BR1200Z1p(BR)

Valido até:  
30/07/2013

(ou na data de rescisão do contrato de certificação)

Santa Rosa de Lima/SC,  
30/07/2012



ECOCERT BRASIL

RUA GERMANO HERMESMEYER, S/Nº  
88.763-000 - SANTA ROSA DE LIMA/SC

*Caetano*

---

ECOCERT BRASIL  
Responsável de Certificação

ECOCERT BRASIL  
Rua Germano Hermesmeier, s/n 88.763-000 - Santa Rosa de Lima/SC  
Tel/Fax: 48-3232.80.33 e mail: [ecocert@ecocert.com.br](mailto:ecocert@ecocert.com.br) CNPJ: 07.404.814 / 0001-30



COP 0077



CERTIFICAÇÃO POR AUDITORIA