

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATERINENSE-UNESC
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

GABRIELA DAMINELLI BORGES

**BIOINDICAÇÃO ATRAVÉS DA *Eisenia fetida* EM SUBSTRATOS DO CAMPO
MOROZINI, TREVISÓ, SANTA CATARINA, BRASIL.**

CRICIÚMA

2013

GABRIELA DAMINELLI BORGES

**BIOINDICAÇÃO ATRAVÉS DA *Eisenia fetida* EM SUBSTRATOS DO CAMPO
MOROZINI, TREVISO, SANTA CATARINA, BRASIL.**

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

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Moraes de
Andrade.**

Co-Orientador: Prof. MSc. Claudio Ricken.

CRICIÚMA

2013

GABRIELA DAMINELLI BORGES

**BIOINDICAÇÃO ATRAVÉS DA *Eisenia fetida* EM SUBSTRATOS DO CAMPO
MOROZINI, TREVISO, SANTA CATARINA, BRASIL.**

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

Criciúma, 28 de junho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Vanessa Moraes de Andrade - Doutora - (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) - Orientador

Prof^a. Maria Júlia Frydberg Corrêa - Angeloni -Mestre - (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC)

Prof. Jairo José Zocche - Doutor - (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC)

Dedico o presente trabalho a todos interessados na área do meio ambiente e suas mudanças e interferências causadas pelo homem. Aos futuros pesquisadores que trabalharão na área da genética toxicológica, assim como os meus seguidores por dar continuidade a este estudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a mãe natureza por me fornecer os seres para realização dos estudos; assim como as inspirações vindas dela. A uma força maior que me empurrou e me levantou a cada dificuldade encontrada.

Agradeço aos meus pais pelo apoio moral e psicológico em tempos em que pensei em desistir de tudo, por ter ido a campo comigo na coleta dos materiais, e por ter me suportado sob estresse e mau humor.

A meu companheiro, por ter me escutado nos últimos dois anos falando sem parar sobre as minhocas e seus aspectos, além de todo estudo, sem entender muita coisa. Por seu carinho e compreensão quando não pude lhe dar atenção e retribuir.

Aos meus orientadores: Vanessa, por todo conhecimento na área da genética toxicológica, pelo apoio e confiança de me ter no laboratório como bolsista de iniciação por dois anos, e por ceder todo material e estrutura necessária para o estudo. Claudio, pela ideia inicial do projeto, pelo fornecimento dos organismos, a invenção do aparelho de choque, e pelo conhecimento na área ambiental.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – LABIM, por me animar durante o experimento e conviver com as minhocas, mesmo com algumas resistências; assim como acompanhar minha trajetória sendo a ISSO 9001, chata durante dois anos. Em especial: a Adriani Damiani e a Daniela Leffa, por me auxiliarem nas correções do TCC assim como na apresentação e a Karina Teixeira e Marcio Alves por me auxiliar na parte experimental, acompanhando passo a passo.

Agradeço ao Roger, por me auxiliar com informações sobre o Campo Morozini e por me acompanhar em campo nas coletas dos substratos.

Finalizando, agradeço as melhores pessoas do mundo, meus parceiros peludos; Rex, Gaia Cuba e Taz, por estarem ao meu lado a todo o momento e as minhas amigas e amigo: Ana Paula Moreira, Maiélen Machado de Jesus, Lucilene Possamai e Gustavo Colombo Dal Pont, por aprenderem junto comigo a importância de uma verdadeira amizade.

“Talvez você será perdoado por matar o peixe pra comer, mas não por ter matado a minhoca para capturá-lo.”

Charles Canela

“Não é a terra que é frágil. Nós é que somos frágeis. A natureza tem resistido a catástrofes muito piores do que as que produzimos. Nada do que fazemos destruirá a natureza. Mas podemos facilmente nos destruir.”

James Lovelock

RESUMO

Sem perceber e com o avanço tecnológico das atividades antrópicas, os seres humanos acabam alterando o meio ambiente e modificando os ecossistemas. Apesar dos vários impactos ambientais, o carvão é mundialmente utilizado como fonte de energia elétrica. No sul do estado de Santa Catarina, a lavra mecanizada teve início por volta de 1940 e tem provocado alterações físicas, químicas e biológicas nos ecossistemas associados às áreas de mineração, comprometendo os recursos hídricos, o solo e à biota de forma direta. O objetivo do presente estudo foi analisar o uso potencial da *Eisenia fetida* como bioindicador de genotoxicidade nos diferentes substratos remanescentes de mineração de carvão em processo de recuperação. As coletas de solo foram realizadas em três ambientes: remanescente florestal sem interferência da mineração (área controle); área em processo de recuperação, com 5 anos de cobertura vegetal; área em processo de recuperação, com 3 anos de cobertura vegetal; e área que sofreu processo de recuperação, com vegetação espontânea. O material biológico foi coletado através de uma técnica não-invasiva, complementada por uma análise de viabilidade celular. Os danos no DNA foram avaliados pelo Teste Cometa. Os resultados para ambos os parâmetros (frequência e índice de danos) em 14 dias de exposição mostram que todos os substratos foram significativamente diferentes do grupo controle. Todos os substratos tiveram diferença significativamente entre si, exceto os grupos 2 e 3. Com 21 dias de exposição para ambos os parâmetros houve uma diferença significativa entre o grupo controle e os demais substratos, porém não houve diferença significativa entre os grupos 2 e 3. Concluímos que, embora estes resultados sejam preliminares, eles sugerem que as minhocas que vivem na bacia carbonífera de Santa Catarina podem futuramente ser estudadas como bioindicadores para a detecção de genotoxicidade em ecossistemas terrestres que têm contato direto ou indireto com a mineração de carvão, assim como foi realizado com a *Eisenia fetida*. Estudos adicionais com uma amostra maior e mesmo com outras espécies de minhocas devem ser realizados a fim de verificar os resultados obtidos neste trabalho preliminar, e para testar novas hipóteses que têm sido formuladas.

Palavras-chave: Genotoxicidade, Minhocas, Carvão, DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização geográfica da área do Campo Morozini.....	17
Figura 2 - Áreas amostrais para coleta do substrato.....	18
Figura 3 - <i>Eisenia fetida</i> (minhoca vermelha da Califórnia).....	19
Figura 4 - Etapas experimentais do Teste Cometa desde a coleta das células até a leitura em microscópio óptico.....	21
Figura 5 - Classes de Dano obtidas pelo Teste Cometa.....	22
Figura 6 - Frequência de danos no DNA em células de celomócitos de minhocas expostas a substratos de área de recuperação. Exposição de 14 e 21 dias.....	24
Figura 7 - Índices de danos no DNA em células de celomócitos de minhocas expostas a substratos de área de recuperação. Exposição de 14 e 21 dias.....	24
Figura 8 - Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese por metais.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.6 OBJETIVOS	16
1.6.1 Objetivo Geral	16
1.6.2 Objetivos Específicos	16
2 MATERIAIS E MÉTODOS	177
2.1 ÁREA DE ESTUDO	177
2.2 ANIMAIS.....	188
2.3 DOS SUBSTRATOS E EXPOSIÇÃO DOS ORGANISMOS.....	19
2.4 COLETA DE CELOMÓCITOS	20
2.5 VIABILIDADE CELULAR	20
2.6 TESTE COMETA.....	20
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
3 RESULTADOS.....	23
3.1 VIABILIDADE CELULAR	23
3.2 TESTE COMETA	23
4 DISCUSSAO	255
5 CONCLUSÃO	299
REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

No mundo atual o assunto mais comentado é a poluição global e seus efeitos sobre o meio ambiente. Devemos começar sempre pensando na definição de poluição: poluição é uma alteração ecológica, ou seja, uma alteração na relação entre os seres vivos, provocada pelo ser humano, que prejudica, direta ou indiretamente, nossa vida ou nosso bem-estar, como danos aos recursos naturais como a água e o solo e impedimentos a atividades econômicas como a pesca e a agricultura (NASS, 2002). Estas alterações causam diversos efeitos colaterais que podem ser pequenas mudanças em que os seres vivos podem se adaptar até sérios contrastes em que os mesmos venham a se extinguir. Meio ambiente se caracteriza pelo local onde um ser vive em condições de chegar à idade adulta e se proliferar (LEMOS; TERRA, 2003).

Sem perceber e com o avanço tecnológico das atividades antrópicas, os seres humanos acabam alterando o meio ambiente e modificando os ecossistemas. De acordo com Lemos e Terra (2003), as fontes de poluição podem ser classificadas de várias formas, dependendo do critério, considerado: origem (doméstica, agrícola, industrial, mineradora); principais componentes (orgânica, metálica, salina); e, propriedades e seus efeitos (tóxicas, putrefativa, inerte, coloidal). A maioria destas alterações é concretizada através do descarte irregular de rejeitos industriais e químicos. Podemos citar alguns destes rejeitos como: pesticidas altamente usados em agricultura; cromo presente em metalúrgicas, termoelétricas; enxofre e ácido sulfúrico presente em esgotos domésticos e industriais, e combustão de carvão (MOLNAR et al., 1989)

O carvão mineral é um combustível fóssil entre os recursos energéticos não renováveis, sendo em longo prazo a mais importante reserva energética mundial em termos de abundância (BORBA, 2001). Apesar dos vários impactos ambientais, o carvão é mundialmente utilizado como fonte de energia elétrica por conter as seguintes características: abundância das reservas; distribuição geográfica das reservas; baixos custos e estabilidade nos preços em relação a outros combustíveis (ANEEL, 2008).

O carvão mineral é uma rocha sedimentar combustível, formada a partir do soterramento, compactação e elevação de temperatura em depósitos orgânicos

de vegetais. Com o passar do tempo, sucessivamente, a matéria orgânica se transforma em turfa, linhito, hulha e antracito. A principal diferença entre eles é a porcentagem de carbono: a madeira possui cerca de 40% de carbono, a turfa 55%, o linhito 70%, a hulha 80% e o antracito de 90 a 96 % (ANEEL, 2008).

O Brasil dispõe de uma das maiores reservas de carvão da América Latina, e os depósitos de maior importância econômica que apresentam o carvão estão na Bacia do Paraná localizada no sul do país, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (BORBA, 2001; SOARES et al., 2006). Em Santa Catarina a exploração das reservas de carvão provocou profundas modificações no ambiente (MARTINS, 2005). Santa Catarina e Rio Grande do Sul detêm conjuntamente 99,8% das reservas carboníferas do país (DNPM, 2004).

As jazidas catarinenses ocorrem nos seguintes municípios: Orleans, Lauro Muller, Urussanga, Siderópolis, Criciúma, Içara, Nova Veneza, Maracajá, Araranguá, Forquilha e Treviso, municípios estes, inseridos na Bacia Carbonífera Catarinense (MILIOLLI, 2009).

O carvão 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).

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

No sul do estado de Santa Catarina, a lavra mecanizada teve início por volta de 1940 (CETEM, 2001) e desde então, assim como a mineração de subsolo, tem provocado alterações físicas, químicas e biológicas nos ecossistemas associados às áreas de mineração, comprometendo os recursos hídricos, o solo e à

biota de forma direta numa extensão que varia de 2000 a 6000 ha (COSTA, 2005; COSTA et al. 2007; ZOCHE-DE-SOUZA, 2007; FREITAS, 2007).

Avaliar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais por si só não é suficiente, havendo a necessidade de se detectar e avaliar o impacto destes poluentes nos organismos expostos, devido ao fato de existirem diferenças na forma de metabolizar os xenobióticos. Para poder detectar e avaliar os efeitos biológicos utiliza-se biomarcadores. A utilização de biomarcadores para detecção de contaminação ambiental iniciou-se no Brasil no final dos anos 90 (BAINY et al., 1999).

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo, entretanto, biomarcadores podem ser definidos como sistemas indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para indicar um alvo específico (SILVA et al., 2003).

De acordo com Jesus (2008), o biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde.

Existem biomarcadores moleculares, celulares e em nível de indivíduo. As duas características mais importantes dos biomarcadores são: permitir identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos; e possibilitar a mensuração de efeitos sub-letais. Esta última característica permite pôr em prática ações remediadoras ou, melhor ainda, ações preventivas. Daí a importância e o interesse atual de incorporação da análise de biomarcadores em programas de avaliação da contaminação ambiental (JESUS, 2008).

Uma questão que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos. Se a resposta for positiva, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação (WALKER et al., 1996).

Biomonitores, também conhecidos como organismos sentinela, vêm sendo utilizados há muito tempo para alertar as pessoas sobre ambientes perigosos. Na seleção de um biomonitor os principais aspectos a serem observados são: os animais devem dividir o mesmo ambiente com o homem; responder de forma

semelhante a químicos tóxicos; e desenvolver patologias similares como resposta a estes efeitos (SILVA et al.,2003).

A principal vantagem de se utilizar organismos sentinela para monitoramento ambiental, comparado ao método tradicional físico-químico, é a informação que ele pode dar em relação à exposição acumulativa em organismos e populações sobre a resposta de letalidade e sub-letalidade, além de detectar efeitos indiretos (BROMENSHENK et al.,1995).

Os organismos mais susceptíveis aos agentes impactantes possuem algumas características que os distinguem dos demais, tornando-se um bioindicador de ambientes e da qualidade do ar, quando indicam a umidade do ar, acidez do solo e pH, além de demonstrarem alta sensibilidade a poluentes, apresentam capacidade de reter contaminantes atmosféricos em suas células, funcionando também como biomonitores (OLIVEIRA et al., 2007).

Biomarcadores quando combinados com bioindicadores podem criar um sofisticado sistema alvo múltiplo para detectar uma variedade de perigos ambientais de forma rápida e economicamente viável, em um único organismo teste (SILVA et al.,2003).

Todos os organismos respondem de maneira muito particular, a uma variedade de alterações no ambiente em que vivem, fornecendo dados fisiológicos, bioquímicos, genéticos e comportamentais (SHUGART, 1994).

As minhocas têm sido usadas como bioindicadores de poluição do ambiente edáfico porque elas têm papel destacado na formação do solo; na decomposição de resíduos de plantas e ciclagem de nutrientes da matéria orgânica; na formação do húmus e de agregados de solo, onde a atividade biológica é mais intensa; no melhoramento da estrutura, fertilidade, porosidade e capacidade de infiltração, drenagem e retenção de água, ar e também no transporte de microorganismos e nutrientes do solo por meio dos canais formados por sua escavação e seus deslocamentos no solo. Por meio de seus deslocamentos e de ingestão de solo ou serapilheira contaminados, as minhocas entram em contato com poluentes que atingem ou são aplicados no solo e nele podem permanecer adsorvidos nas partículas minerais, na matéria orgânica e na solução do solo. Elas podem ainda se expor e absorver os contaminantes da solução do solo por meio de contato direto e passagem pela cutícula. A partir desse contato, as minhocas podem se intoxicar,

morrer, ou sobreviver, incorporar e até bioacumular esses poluentes em seus tecidos (ANDREA, 2008).

Em muitos ecossistemas, as minhocas são espécies-chave nas comunidades de decompositores, tendo assim grandes impactos na atividade de decomposição, mineralização de nutrientes e a base da cadeia alimentar (COLEMAN ; INGHAM, 1988). Isso torna as minhocas um dos organismos bioindicadores mais adequados para avaliação de risco no solo (ISO,1998). Minhocas estão facilmente disponíveis, são sensíveis e fáceis de manusear, estando disponíveis para utilização em testes de toxicidade. *Eisenia fetida* pode ser facilmente cultivada em laboratório e uma espécie recomendada para testes toxicológicos (OCDE, 1984).

As minhocas estão distribuídas pelos solos úmidos de todo o mundo, algumas medem apenas alguns centímetros e outras com um a dois metros de comprimento. Elas vivem enterradas (são animais subterrâneos), escavam galerias e canais, buscando abrigo e restos vegetais, seu principal alimento ingeridos com grandes quantidades de terra. São animais detritívoros, pois se alimentam de detritos de várias origens que compõem o húmus (BRUSCA ; BRUSCA, 2007).

A genotoxicidade é o setor da genética que estuda os fatores que alteram a base genética da vida, em sua estrutura físico-química, o DNA (ácido desoxirribonucléico), sendo este processo chamado de mutagênese. A genotoxicidade estuda como o organismo se encontra exposto a algum agente de toxicidade, analisando o que perturba a vida ou induz a morte, tanto em nível de célula como de organismo. É uma especialidade recente que se situa entre toxicologia e genética, por isso é também denominada genética toxicológica (ERDTMANN, 2003).

A genética toxicológica engloba o estudo dos possíveis agentes causadores de genotoxicidade e seus mecanismos de ação. Quando estes agentes estão inseridos ou têm repercussão no meio ambiente ou na biota podemos especializar o conceito de genética toxicológica para genética toxicológica ambiental (BORTOLOTTI, 2007). Dentro dessa área da ciência existem os bioensaios que são utilizados para o monitoramento da genotoxicidade ambiental, dentre eles o Teste Cometa (SILVA; FONSECA, 2003).

O teste cometa está sendo utilizado para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção

de substâncias genotóxicas, entretanto, esse teste não detecta mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações essas lesões são passíveis de correção, e dessa maneira esse teste também pode ser utilizado para estudos de reparo no DNA (GONTIJO; TICE, 2003).

O Ensaio Cometa ou gel de eletroforese em célula única (SCGE) foi introduzido pela primeira vez por Östling e Johanson (1984) através da técnica microeletroforética para visualização direta dos danos no DNA em células individuais. Nessa técnica observou-se que nas células irradiadas, após a corrente elétrica com pH neutro, partes do DNA foram arrastadas do seu núcleo e fragmentos produzidos por *crosslinks* (ligações cruzadas) e quebras duplas na fita de DNA (DSB) migraram mais, resultando na imagem de um “cometa”.

Este teste de genotoxicidade apresenta vantagens sobre outros testes, pois ele inclui: sensibilidade para detecção de níveis de dano no DNA; exige um número reduzido de células por amostras; flexibilidade; baixo custo; facilidade de aplicação; habilidade para conduzir estudos usando pequenas amostras da substância teste; e possui um período de tempo relativamente curto para obtenção de resultados. Devido a essas características esse teste é amplamente utilizado para pesquisar áreas que variam das humanas até biomonitoramento ambiental, aos processos de reparo do DNA na genética toxicológica (TICE et al., 2000). Devido ao alto potencial bioacumulador das minhocas foi empregada a fase de testes com o Ensaio Cometa, para avaliar se as mesmas por estarem sendo expostas a um solo de remanescentes de mineração alterados com os metais pesados, poderiam se tornar um bom bioindicador (organismo sentinela) para futuros estudos na área de genotoxicidade (ANDREA, 2008).

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Analisar o uso potencial da *Eisenia fetida* como bioindicador de genotoxicidade nos diferentes substratos remanescentes de mineração de carvão em processo de recuperação.

1.6.2 Objetivos Específicos

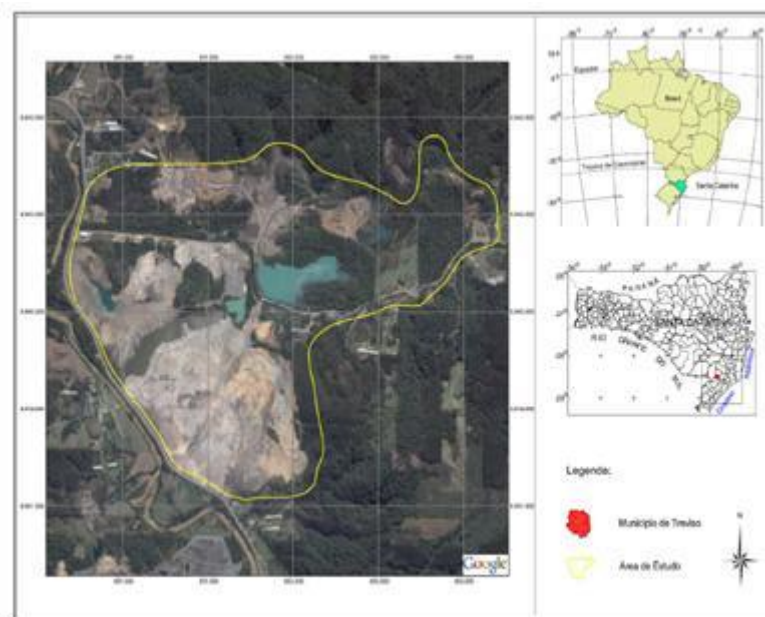
- Avaliar a viabilidade celular nos indivíduos expostos a diferentes substratos remanescentes de mineração de carvão em processo de recuperação.
- Avaliar o uso da minhoca *Eisenia fétida* como bioindicador de poluição pela exploração de carvão.
- Avaliar a genotoxicidade presente nos substratos remanescentes de mineração de carvão em processo de recuperação através do Ensaio cometa.
- Comparar os substratos em recuperação remanescentes de mineração de carvão entre si e com o substrato controle, avaliando sua qualidade ambiental.
- Comparar os diferentes tempos de exposição entre os diferentes substratos remanescentes de mineração de carvão em processo de recuperação

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

A coleta das amostras de substratos foi realizada no município de Treviso, Santa Catarina. O acesso principal a área é realizado pela rodovia SC-447 que liga Siderópolis a Treviso. A área de onde provém os substratos em estudo corresponde a cerca de 220 ha que sofreram influência da mineração a céu aberto iniciada em 1982 e finalizado em 1989 pela Carbonífera Próspera S.A., com uso da *dragline* Marion (IPAT, 2009) (Figura 1).

Figura 1 - Localização geográfica da área do Campo Morozini.



Fonte:IPAT,2009.

As coletas de solo foram realizadas em três ambientes: Estação amostral 1: remanescente florestal sem interferência da mineração, (área controle); Estação Amostral 2: área em processo de recuperação com 5 anos de cobertura vegetal; Estação amostral 3: área em processo de recuperação com 3 anos de cobertura vegetal; Estação amostral 4: área que sofreu processo de recuperação, porém, não houve implantação de vegetação, passando pela etapa de regeneração vegetacional espontânea, onde a cobertura vegetal presente é composta por espécies herbáceas

como gramíneas e leguminosas; espécies arbóreas pioneiras associadas a espécies herbáceas; espécies arbóreas secundárias e climácicas (IPAT, 2009). (Figura 2)

Figura 2 - Áreas amostrais para coleta do substrato.



Fonte: Google, 2010.

2.2 ANIMAIS

Para realização das análises será utilizada a espécie *Eisenia fetida*. Os organismos pertencem ao Reino Animalia, Filo Annelida, Classe Oligocheata, Ordem Haplotaxida, Família Lumbricidae, Gênero Eisenia, Espécie *Eisenia fetida*. Os animais adquiridos foram criados de acordo com os guidelines da OECD (1984). Para realização dos testes serão utilizados, quinze indivíduos da espécie *E. fetida* para cada exposição, pesando de 300 a 600 mg e com clitelo bem desenvolvido (Figura 3).

Figura 3 - *Eisenia fetida* (minhoca vermelha da Califórnia).



Fonte: Joseph Yard,2007.

2.3 DOS SUBSTRATOS E EXPOSIÇÃO DOS ORGANISMOS

Foram coletados 60 cm de substrato de cada estação amostral, pois o substrato reconfigurado topograficamente teve aplicação de uma camada de 50 cm de material argiloso, com vistas a produzir um solo construído que tenha estabilidade (IPAT, 2009). Os substratos foram secos em estufa de ar circulante, após a secagem os substratos foram colocados nos aquários onde foi acondicionada uma umidade de 40-50% e temperatura 22 ± 2 °C, mantidas através do acréscimo de água destilada e controle do ar condicionado, respectivamente. Estes substratos então passaram por uma homogeneização individualmente dentro de seus respectivos aquários (Controle, substrato em recuperação há 5 anos e substrato em recuperação há 3 anos, e área de vegetação espontânea). (OCDE, 1984).

Os 60 indivíduos foram aclimatados por sete dias em um substrato nas normas da OECD livre de qualquer contaminante e com 40% de umidade e temperatura 22 ± 2 °C em um ciclo de 12h luz/escuro previamente à exposição. Após a aclimação foram introduzidos 15 indivíduos em cada substrato amostral nas mesmas condições, onde ficaram por 14 e 21 dias até a realização do teste;este tempo de exposição foi estipulado devido ao tempo de aclimação que as minhocas levam de 7 dias; portanto 14 dias para primeira avaliação toxicológica (agudo) e 21 dias para uma segunda avaliação toxicológica (sub-cronica), (KOBAYASHI, 2001).

2.4 COLETA DE CELOMÓCITOS

Para a coleta de celomócitos foi realizada uma técnica não invasiva, as minhocas foram lavadas individualmente em solução salina LBSS (*Lumbricus balanced salt solution*) a 4° C, colocadas sobre um papel toalha úmido e estimuladas para expulsar o conteúdo da parte inferior do intestino de modo a reduzir a contaminação fecal do fluido durante a extrusão. Cada minhoca foi seca sobre o papel toalha e colocada em tubo falcon com 3 mL de LBSS a 4°C e estimuladas 10 vezes utilizando impulsos curtos (1 s) de 6-9 V sob corrente contínua, com objetivo de liberar espontaneamente os celomócitos através dos poros do tegumento. Os tubos foram suavemente homogeneizados e as minhocas foram removidas (KOBAYASHI, 2001).

2.5 VIABILIDADE CELULAR

O teste de viabilidade celular foi realizado para verificar se a porcentagem de células viáveis seriam suficientes para prosseguir os ensaios de genotoxicidade. Para realização da técnica foram feitos os seguintes passos: transferir de um tubo de ensaio para outro 80 µL de LBSS com os celomócitos e 20 uL de corante Trypan Blue. Aguarda-se 10 minutos para a absorção do corante em temperatura ambiente. Após realiza-se a contagem das células na câmara de Neubauer (ISO, 2002).

2.6 TESTE COMETA

O protocolo utilizado na execução do teste é baseado na versão alcalina desenvolvida por Singh et al. (1988) e Meehan et al. (2003) com algumas modificações. Foram coletados 20 µL da suspensão de cada animal embebidos em 80 µL de agarose Low Melting Point (0,75%), essa mistura foi colocada em lâmina de microscópico (duas lâminas por animal, ou seja, duplicata), pré-revestida com cobertura de agarose normal (1,5 %) e após foi coberta com uma lamínula. Depois da solidificação em geladeira duas vezes por aproximadamente 5 minutos cada, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e depois as lâminas imersas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora

do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) com alta concentração de sais e detergentes a fim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear, por no mínimo uma hora ou até duas semanas. Posteriormente, as lâminas são imersas em um tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 12.6), por 30 minutos. Tal processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundárias e terciárias presentes no núcleo celular. Imediatamente ao desenovelamento, as lâminas são submetidas a uma corrente elétrica por mais 15 minutos, 20 V e 300 mA, de modo a induzir a migração para fora do núcleo dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras. Finalmente as lâminas foram coradas com nitrato de prata (VILLELA et al., 2006). (Figura 4)

Quanto à observação ao microscópio óptico, serão analisadas 100 células por indivíduo (50 de cada lâmina duplicada). As células também serão classificadas, visualmente, em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda: sem danos – classe 0; até danos máximos – classe 4 (Figura 5). Assim, o Índice de Danos de cada grupo estudado irá variar de zero (100X0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100X4; 100 células observadas com dano máximo) (COLLINS, 2004). A frequência de danos (FD em %) será calculada em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda.

Figura 4 - Etapas experimentais do Teste Cometa desde a coleta das células até a leitura em microscópio óptico.

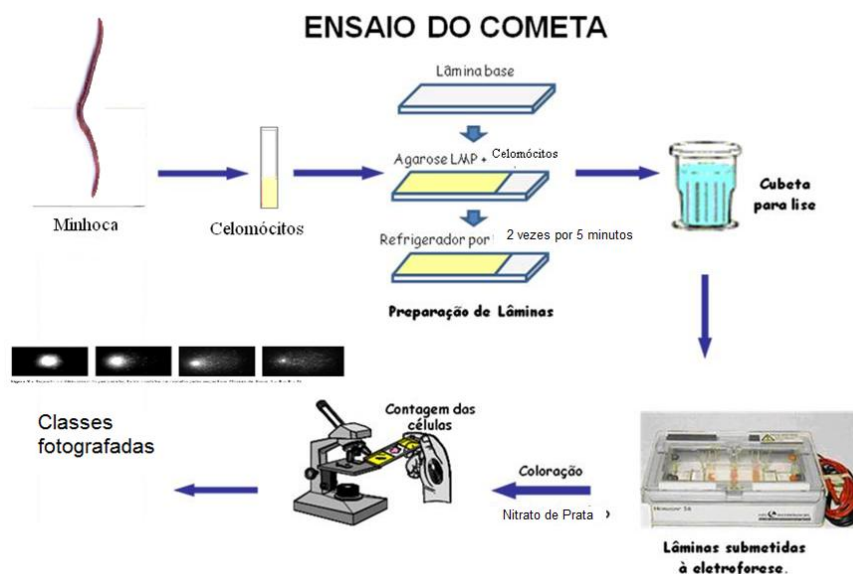


Figura 5: Classes de Dano obtidas pelo Teste Cometa.

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

Fonte: VILLELA et al., 2006.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados para o índice e frequência de danos no DNA são apresentados como média e desvio padrão. A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As análises estatísticas para Índice e Frequência de Danos entre as quatro áreas e diferença entre as minhocas expostas na área controle e nas áreas recuperadas foram avaliadas utilizando ANOVA (Análise de variâncias, 1 critério) e como post-hoc foi utilizado o Teste Tukey. O nível crítico para rejeição da hipótese foi considerando um P valor de 5%, e o pacote estatístico utilizado foi o Bioestat 5.0.

3 RESULTADOS

Em geral, foi observado que com o passar do tempo alguns dos organismos expostos aos substratos contaminados foram se adaptando enquanto outros não conseguiram se adaptar e conseqüentemente morreram. No final dos 14 dias de exposição dos 15 organismos colocados nos seus respectivos aquários percebeu-se que a quantidade diminuiu, exceto para o substrato controle. Após os 21 dias não foram observados declínios no número de organismos, podendo indicar uma possível aclimação aos substratos.

3.1 Viabilidade Celular

Os resultados da viabilidade celular, realizada individualmente nas minhocas de cada substrato (grupo amostral). Foram avaliados 6 indivíduos de cada um dos substratos (controle - grupo 1, vegetação espontânea - grupo 2, área de implantação há 5 anos - grupo 3, área de implantação há 3 anos - grupo 4), respectivamente. Todos os organismos, independentemente do substrato de exposição apresentaram viabilidade celular acima de 80%.

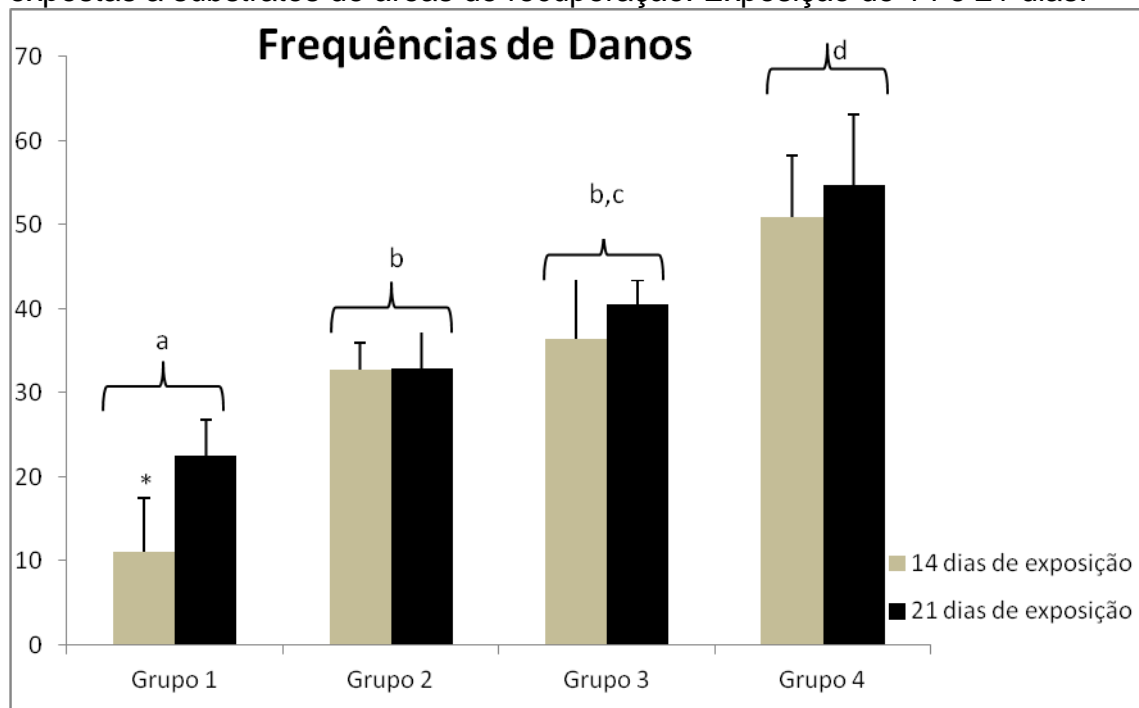
3.2 Teste Cometa

Os resultados de danos ao DNA nos grupos expostos aos 4 substratos estão representados nas figuras 6 e 7, demonstrando os índices e frequência de danos para 14 e 21 dias, respectivamente.

Os resultados da frequência de danos para os 14 dias de exposição mostram que todos os substratos foram significativamente diferentes do grupo controle com $p < 0,01$ (teste ANOVA, post-hoc Tukey). Todos os substratos tiveram diferença significativamente entre si, exceto os substratos da área de vegetação espontânea (grupo 2) e o de implantação há 5 anos (grupo 3). No índice de danos os resultados mostram que todos os demais substratos tiveram uma diferença significativa do controle com 99% de confiança ($p < 0,01$). Entre os substratos das áreas de vegetação espontânea (grupo 2), implantação há 3 anos (grupo 4), e implantação há 5 anos (grupo 3) houve diferença significativa com $p < 0,01$. Não

foram observadas diferenças significativas entre os substratos das áreas de vegetação espontânea (grupo 2) e implantação há 5 anos (grupo 3), respectivamente. Com 21 dias de exposição para a frequência de danos os resultados indicaram que houve uma diferença significativa de $p < 0,01$ entre o grupo controle e os demais substratos. Entre os substratos foi observada uma diferença significativa de $p < 0,01$; exceto entre o substrato da área de vegetação espontânea (grupo 2) e implantação há 5 anos (grupo 3). Para o índice de danos os resultados mostram que todos os substratos foram significativamente diferentes do controle com $p < 0,01$, exceto a área de vegetação espontânea (grupo 2). Obtivemos nos demais grupos diferenças significativas ($p < 0,01$), exceto entre os substratos de vegetação espontânea (grupo 2) e a área de implantação há 5 anos (grupo 3).

Figura 6 – Frequência de danos no DNA em células de celomócitos em minhocas expostas a substratos de áreas de recuperação. Exposição de 14 e 21 dias.

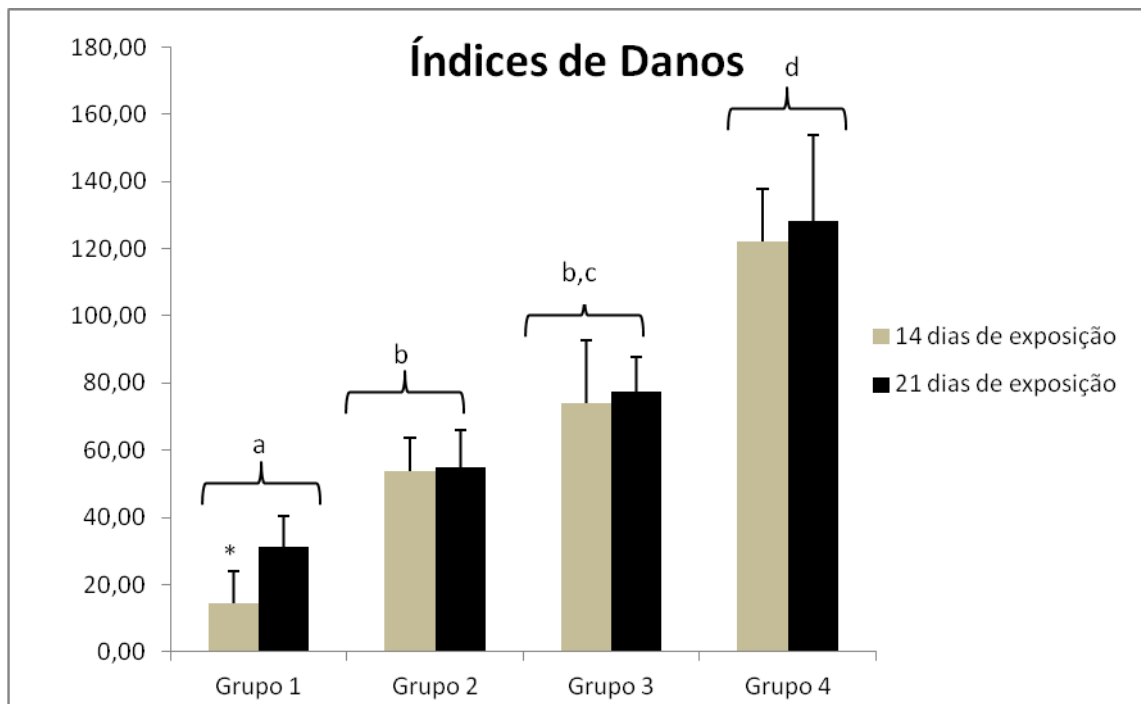


*Diferença significativa entre os tempo de exposição.

Letras iguais: diferenças não significativa entre os grupos de exposição.

Letras diferentes: diferenças significativas entre os grupos de exposição com $p > 0,01$.

Figura 7 - Índices de danos no DNA em células de celomócitos de minhocas expostas a substratos de área de recuperação. Exposição de 14 e 21 dias.



Diferença significativa entre os tempo de exposição.

Letras iguais: diferenças não significativa entre os grupos de exposição.

Letras diferentes: diferenças significativas entre os grupos de exposição com $p > 0,01$.

4 DISCUSSÃO

A mineração de carvão é uma atividade com um alto potencial de poluição ambiental. Toda a mineração modifica o terreno no processo de extração mineral e deposição de rejeitos (KOPEZINSKI, 2000). A mineração é considerada uma das atividades humanas que mais contribui para a alteração da superfície terrestre, provocando expressivos impactos sobre a água, o ar, o solo e o subsolo. A degradação é um processo inerente à atividade de mineração e sua intensidade depende do volume explotado, do tipo de mineração e dos rejeitos produzidos (GRIFFITH, 1980). A qualidade do solo pode ser definida como a capacidade contínua de aceitar, estocar e reciclar água, nutrientes e energia, bem como reter, dispersar e transformar materiais químicos e biológicos, funcionando como um tampão ou filtro ambiental (JAHNEL et al., 2007). Metais pesados podem ser genotóxicos causando quebras simples e duplas nas fitas de DNA (ácido desoxirribonucléico) através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

(MANERIKAR et al., 2007). O comportamento de um agente tóxico pode, especialmente no solo, não ser completamente compreendido caso não conhecemos suas propriedades físico-químicas. Este desconhecimento pode então resultar em interações com outras substâncias (POKARZHECKII; VAN STRAALLEN, 1996).

Minhocas têm uma função importante na cadeia alimentar, por serem organismos de base. A contaminação do solo pode então ser um fator limitante para a população destes organismos. Conhecendo os possíveis efeitos genotóxicos nas minhocas, se torna uma ferramenta útil, a utilização da mesma para a previsão dos possíveis danos em toda cadeia alimentar, devido à contaminação do solo. De fácil acesso e sem muita manutenção, com ciclo de vida curto, são características que fazem com que as minhocas se tornem um modelo adequado para testes de ecotoxicidade (MANERIKAR et al., 2007). Em muitos ecossistemas, minhocas são a chave na comunidade decompositora, tendo grande impacto na decomposição, mineralização de nutrientes e formações primárias (COLEMAN; EDWARDS, 1988). Estes organismos diferem de outros por não possuírem uma cutícula espessa na sua derme, tornando-os suscetíveis a absorverem agentes químicos presentes no solo (LANNON et al., 2004; NAHMANI et al., 2007).

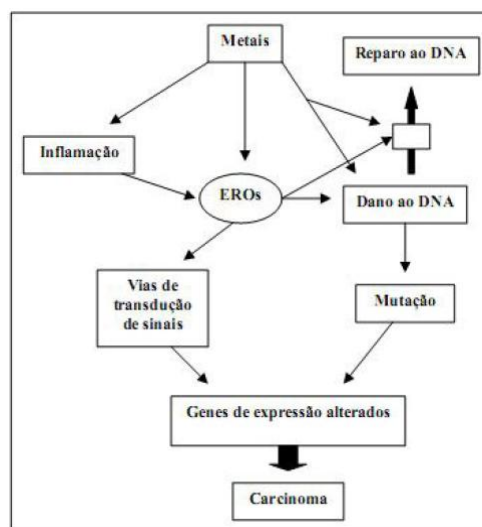
Este é o primeiro estudo realizado com invertebrados edáficos do filo Annelida na bacia carbonífera catarinense. Infelizmente são poucos os trabalhos no mundo utilizando anelídeos principalmente em área de mineração o que dificulta comparações adequadas de nossos resultados.

Em todos os grupos foi observada uma grande porcentagem de viabilidade celular, mesmo com a morte de alguns dos organismos antes dos 14 dias. Nossos resultados mostram que nos primeiros 14 dias de exposição aos substratos as taxas do índice e a frequência de danos foram maiores que aos 21 dias, podendo indicar que os organismos foram sofrendo pequenas adaptações. Possíveis explicações para os resultados encontrados podem ser o grande potencial adaptativo fisiológico e genético da *Eisenia fetida*. As células utilizadas para os bioensaios foram os celomócitos, cuja função é de extrema importância no sistema imunológico da *Eisenia fetida*. Algumas dessas funções são defesa antimicrobiana, reações de encapsulação, cicatrizantes, fagocitose e mecanismos de defesa celular (BYZOVA, 1974; COOPER; STEIN, 1981; VALEMBOSIS, 1982, 1992, 1994;

COOPER, 1996; COSSARIZZA et al., 1996). Em ambos os tempos de exposição foi observado altos níveis de danos em todos os grupos exceto para o controle. O grupo que obteve maior taxa de dano foi o grupo 4, que teve a implantação há 3 anos. Os grupos 2 e 3 (vegetação espontânea e implantação há 5 anos, respectivamente), demonstraram níveis de danos aproximados. Estas taxas indicam que áreas mineradas mesmo com execuções de recuperações de solo e implantações de vegetação, podem demorar muitos anos para voltar a serem um ecossistema equilibrado.

Outras explicações para os altos níveis de toxicidade podem ser pela razão de que quando expostas a metais pesados mesmo que em baixas doses. Os metais pesados podem causar efeitos adversos em sistemas biológicos, entre eles, genotoxicidade e carcinogenicidade (PARAÍBA, 2006). Além disso, podem produzir quebras na fita-dupla de DNA (DSBs) indiretamente, através do estresse oxidativo, como descrito por Gastaldo et al. (2009). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio, criado pela excessiva geração de oxidantes ou uma diminuição de antioxidantes (GUO; YANG; WU, 2008). A geração de ROS pode desestruturar células, afetando seu metabolismo causando diversas disfunções, inclusive interferindo em sua viabilidade (MANERIKAR et al., 2007).

Figura 8 – Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese por metais.



Fonte: Adaptada de Galaris e Evangelou (2002).

De acordo com o esquema acima, os metais podem provocar dano ao DNA de forma direta ou indireta pela formação das ROS. A geração das ROS 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 tiorradicais ($\text{RSH} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{RS}\cdot + \text{Cu}^{++}\text{H}^+$). 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. Mudanças nos níveis das ROS também influenciam no equilíbrio redox intracelular, afetando fortemente as vias de transdução de sinais, as quais ativam ou inativam vários fatores de transcrição. 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 (BENASSI, 2004).

5 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo realizado com invertebrados edáficos do filo Annelida na Bacia Carbonífera Catarinense. Os resultados sugerem que a atividade mineradora, oferece contribuição aos elevados danos no DNA de celomócitos desta espécie.

Os resultados encontrados neste estudo, mais uma vez, apontam para a sensibilidade do Ensaio Cometa, advertindo contra uma possível contaminação de espécies de minhocas que habitam áreas de mineração. Embora estes resultados sejam preliminares, eles sugerem que as minhocas que vivem na bacia carbonífera de Santa Catarina podem ser utilizadas como bioindicadores, assim como a *Eisenia fetida*, para a detecção de genotoxicidade em ecossistemas terrestres que têm contato direto ou indireto com a mineração de carvão.

Estudos adicionais com uma amostra maior e mesmo com outras espécies de minhocas devem ser realizados a fim de verificar os resultados obtidos neste trabalho preliminar, e para testar novas hipóteses que têm sido formuladas.

REFERÊNCIAS

- ANDREA, M. M. de **Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/index.htm>. Acesso em: 5 abr. 2012.
- ANEEL. **Carvão Mineral**, 2008. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br.html>>. Acesso em: 2 abr.2012.
- BAINY, A. C. D.; WOODIN, B. R.; STEGEMAN, J. J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir São Paulo, Brazil. **Aquatic Toxicology**, São Paulo, v. 44, p. 289-305, 1999.
- BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2004].
- BORBA, R. F. **Carvão Mineral**. Balanço Mineral Brasileiro, Porto Alegre, out, 2001. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br, htm>>. Acesso em: 28 set. 2011.
- BORTOLOTTI, T. **Avaliação da atividade tóxica e genotóxica de percolados do aterro sanitário municipal de sombrio, Santa Catarina, utilizando *Artemia sp.* e *Allium cepa* L.** 2007. 79 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.
- BROMENSHENK, J. J.; SMITH, G. C.; WATSON, V. J. Assessing ecological risks in terrestrial systems with honey bees. In: BUTTERWORTH, B. E.; CORKUM, L. D.; GUZMÁN-RINCÓN, J. **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. New York: Plenum Press, 1995. p. 9-30.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 968 p.
- CETEM. Centro de Tecnologia Mineral. **Projeto conceitual para recuperação ambiental da Bacia Carbonífera Sul Catarinense**. Relatório Técnico elaborado para o SIECESC. v.1 e 2, 2001.
- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.
- COSTA, S. **Metais pesados (Pb, Mn e Zn) em áreas de mineração de carvão a céu aberto reabilitadas: concentração em plantas utilizadas como forrageiras pelo gado bovino**. 2005. 38 f. Relatório Final (Programa de Iniciação Científica)- Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2005.

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

DAMIANI, A. P. **Metais pesados e danos ao DNA de células sanguíneas de morcegos insetívoros em áreas de mineração de carvão da Bacia Carbonífera Catarinense**. 2010. 60 f. TCC (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2010. Disponível em : <<http://www.bib.unesc.net>. Acesso em: 30 janeiro de 2012.

DNPM. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Informe Mineral: Desenvolvimento & Economia mineral**. Brasília: Abril, 2004. Disponível em. www.dnpm.gov.br/informe_mineral. Acesso em: 5 abr. 2012.

ERDTMANN, B. A Genotoxicidade de Todos os Dias. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p 23-25.

FREITAS, M. **Alterações anatômicas em raízes e folhas de *Typha domingensis* Pers. (TYPHACEAE) e a concentração de Zn e Mn nos efluentes da mineração e do beneficiamento de carvão**. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais)– Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.

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

GASTALDO, J.; VIAU, M.; BOUCHOT, M.; JOUBERT, A.; CHARVET, A.; FORAY, N. Induction and repair rate of DNA damage: A inified model for describing effects of external and internal irradiation and contamination with heavy metals. **Journal of Theoretical Biology**, v. 251. p. 68-81, 2009.

GONTIJO, Á. M. M. C.; TICE, R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra, 2003. p. 247-271.

GRIFFITH, J. J. **Recuperação Conservacionista da Superfície de Áreas Mineradas: uma revisão de literatura**. Boletim Técnico, Viçosa-MG: Sociedade de Investigações Florestais, UFV, 106 p, 1980.

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

INGHAM, E.R; D.C. COLEMAN. Effects of streptomycin, cycloheximide, fungizone, captan, carbofuran, cygon and PCNB on soil microbe populations and nutrient cycling. **Microbial Ecology** .(1984). 10:345-358.

ISO. International Organization for Standardization), 1998, ISO 11268-2. **Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: determination of effects on reproduction**. Geneva, ISO.

IPAT; UNESCO. **Diagnóstico Ambiental Campo Morozini**. Relatório Técnico. 139 p. 2009.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 2002, **Draft. Avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals – Part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida*)**. Geneva, ISO.

JAHNEL, M. C. **Método de plaqueamento por gotas e outros parâmetros microbiológicos na avaliação da degradação de lodo ativado de curtume em solos**. 1997. 79 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

JESUS, T. B. de; CARVALHO, C. E. V. de. Utilização de Biomarcadores em Peixes como Ferramenta para Avaliação de Contaminação Ambiental por Mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

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

KOBAYASHI, H; OHTOMI, M; SEKIZAWA, Y; OHTA, N. Toxicity of coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida* to vertebrates but not invertebrates: probable role of sphingomyelin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Japão, Part C, v.128, p.401-411, 2001. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255113>> Acesso: 27 de junho de 2012.

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

LEMOS, C. T.; TERRA, N. R. Poluição: Causas, efeitos e controle. **Genética Toxicológica**. p.119-137, 2003.

MARTINS, A. A. **Sócio-economia do carvão em Santa Catarina: uma contribuição ao estudo de sua trajetória**. 2005.186 f. Dissertação (Mestrado em Economia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MEEHAN, K. A.; TRUTER, E. J.; SLABBERT, J. P.; PARKER, M. I. Evaluation of DNA damage in a population of bats (Chiroptera) residing in an abandoned monazite mine. África do Sul, **Mutation Research**, v. 557, n. 2004, p. 183–190, 2003.

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

MOLNAR, L., Fischer, E., Kallay, M., 1989. Laboratory studies on the effect, uptake and distribution of chromium in Eisenia fetida (Annelida, Oligochaeta). **Zool. Anz.** 223, 57.

NASS, D. P. Revista Eletrônica de Ciências . **O conceito de poluição** .Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo .Número 13 - Novembro de 2002. Disponível em: <<http://graduacao.iqsc.usp.br/files/poluicao.pdf>> Acesso em : 5 abr.2012.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS; **PROPOSAL FOR UPDATING GUIDELINE 208**. 1984.Disponível em: www.oecd.org Acessado em: Dezembro de 2011.

OLIVEIRA, F. de.; PEREIRA, F; EUGÊNIA C.; LIMA, E. S. de; SILVA, N. H. da.; FIGUEIREDO, R. C. B. Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando Cladonia verticillaris (líquen) como biomonitor. **Química Nova**, Recife, v. 30, n. 5, p. 1072-1076, 2007.

REIS, N.R; PERACCHI, A.L; PEDRO, A.W; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil**. Biblioteca Nacional, Londrina: nome da Editora, Pr. 256p. 2007.

SHUGART, L.R. **Biological monitoring**. In: RENZONI, A., MATTEI, N., LARI, L. FOSSI, M.C. (eds.), Contaminants in the environment: a multidisciplinary assessment of risks to man and others organisms. CRC press, New York, p. 29-36, 1994.

SILVA, Juliana da; FONSECA, Mirian Benício da. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.p 83.

SILVA, Juliana da; HEUSER, Vanina; ANDRADE, Vanessa. Biomonitoramento Ambiental. In: **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.p 170-174.

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

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

Técnica de May-Grunvald (**Teste de Micronúcleo**). Disponível em: <http://intranet.doles.com.br/temp/produtos/instrucoes/MAY-GRUNWALD.pdf>. Acessado em: Dezembro de 2011.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

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

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

WALKER, L.A.; SIMPSON, V.R.; ROCKETT, L.; WIENBEURG, C.L.; SHORE, R.F. Heavy metal contamination in bats Britain. **Environmental Pollution**, v.48, p.483-490, 1996.

YARD, J. Eisenia fetida. Disponível em:

http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2010/yard_jose/index.htm. Acessado em 8 de março de 2013.

ZOCHE-DE-SOUZA, P. **Metais pesados em áreas de mineração de carvão: o uso potencial de banhados biológicos construídos no biopolimento da água de drenagem ácida de Mina, tratada por processos físicoquímicos**. 2007. 17 f. Relatório de Iniciação Científica (Programa de Iniciação Científica)- Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.