



UNILASALLE
CENTRO UNIVERSITÁRIO LA SALLE



ADRIANE PERACHI NORDIN

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA *IN VITRO* DE MINERAIS CRISTALIZADOS
SOBRE ROCHAS PRESENTES EM DRENAGENS DE MINA DE CARVÃO

CANOAS 2015

ADRIANE PERACHI NORDIN

AVALIAÇÃO GENOTOXICA *IN VITRO* DE MINERAIS CRISTALIZADOS
SOBRE ROCHAS PRESENTES EM DRENAGENS DE MINA DE CARVÃO

Dissertação apresentada à banca examinadora do curso de Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais do Centro Universitário La Salle – Unilasalle, como exigência parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Prof^a. Dr^a Fernanda Rabaioli da Silva

Prof. Dr. Luis Felipe Silva Oliveira

CANOAS, 2015

ADRIANE PERACHI NORDIN

DISSERTAÇÃO

Dissertação apresentada à banca examinadora do curso de Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais do Centro Universitário La Salle – Unilasalle, como exigência parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Aprovado pela banca examinadora em 18 de agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a. Ana Paula Simões Menezes

Prof.^a. Dr.^a. Kátia da Boit Martinello

Prof. Dr. Rubens Müller Kautzmann

RESUMO

A Região Sul do país dispõe da maior reserva de carvão mineral, com aproximadamente 28,8 bilhões de toneladas. Atualmente, o estado com a segunda maior produção de carvão mineral é Santa Catarina. Tanto as atividades de extração como de beneficiamento do carvão acabam gerando um grande volume de rejeitos, sendo que na maioria dos casos esses rejeitos são manuseados/descartados de maneira incorreta, gerando danos não apenas a saúde humana, mas também ao solo, rios, atmosfera e nos organismos vivos em geral. Muitas vezes esses rejeitos, formam drenagens ácidas e em tal ambiente, acabam sendo cristalizados diversos minerais, ainda pouco estudados pela ciência toxicológica. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar minerais secundários, bem como o potencial genotóxico das amostras coletadas de drenagem de mina de carvão (DMC) que desaguam no Rio Rocinha (SC). Para identificar este potencial foram aplicados ensaios de genotoxicidade (ensaio Cometa e teste de Micronúcleo), em células V79. A caracterização das amostras foram desenvolvidas por difração de Raio-X e a composição química das amostras foram realizadas através da técnica de Emissão de raios X induzida por partículas (PIXE). De acordo com os resultados foi possível observar que as amostras 1 e 2, por serem mais concentradas em evaporitos e em elementos potencialmente tóxicos, induziram dano ao DNA ($P < 0,05$) apresentando, portanto, um potencial genotóxico, quando comparadas ao controle negativo. Esse aumento de dano pode ser explicado devido o incremento das concentrações de elementos como Al, Cu, Cr, Fe, Ni e Zn nas amostras. Estes elementos são encontrados em grande quantidades e por estarem presentes como elementos majoritários em minerais altamente solúveis em água, tornaram, as amostras genotóxicas em células V79.

ABSTRACT

The South Region has the largest coal reserves, with about 28.8 billion tons. Currently, the state with the second largest coal production is Santa Catarina. Both extraction activities such as coal beneficiation end up generating a large volume of waste, and in most cases these wastes are handled / disposed of incorrectly, causing damage not only to human health but also to the soil, rivers, atmosphere and living organisms in general. Often these wastes, form acidic drainage and in such an environment, end up being several minerals crystallized, still little studied by toxicological science. The objective of this study was to identify such secondary minerals, as well as the genotoxic potential of samples of coal mine drainage (DMC) which flow into the Rio Rocinha (SC). To identify this potential were applied genotoxicity assays (comet assay and micronucleus test) in V79 cells. The characterization of samples was developed by X-ray diffraction and chemical composition of the samples was made by emission technique of X-ray induced by particles (PIXE). According to the results it was observed that samples 1 and 2, to be more concentrated in evaporates and potentially toxic elements, induced DNA damage ($P < 0.05$), thus presenting a genotoxic potential, when compared to the control negative. Such damage increase can be explained by the increase of concentrations of elements such as Al, Cu, Cr, Fe, Ni and Zn in the samples. These elements are found in large amounts and are present as the major mineral components in highly soluble in water, they have made the genotoxic samples in V79 cells.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 Problema | 12 |
| 1.2 Objetivos | 12 |
| <i>1.2.1 Objetivo Geral</i> | 12 |
| <i>1.2.2 Objetivos Específicos</i> | 13 |
| 1.3 JUSTIFICATIVA | 13 |
| 2.REFERENCIAL TEORICO | 14 |
| 2.1 Carvão Mineral | 14 |
| 2.2 O Processo de Beneficiamento do Carvão Mineral | 16 |
| 2.3 Drenagens de Mina de Carvão (DMC) | 17 |
| 2.4 Evaporitos | 20 |
| 2.5 Consequências ambientais da mineração | 22 |
| 2.6 Ensaio de Genotoxicidade | 24 |
| <i>2.6.1 Ensaio Cometa</i> | 25 |
| <i>2.6.2 Teste de micronúcleo</i> | 26 |
| 2.7 Biomonitoramento Ambiental na mineração | 27 |
| 3. METODOLOGIA | 29 |
| 3.1. Coleta das amostras | 29 |
| 3.2 Quantificação dos elementos químicos (PIXE) | 30 |
| 3.3 Difração de Raio-X (DRX) | 30 |
| 3.4 Cultura Celular | 31 |
| 3.5 Técnica da redução do metil tetrazólio (MTT) | 32 |
| 3.6 Escolha das dosagens | 33 |
| 3.7 Ensaio Cometa | 34 |
| 3.8 Teste de Micronúcleo | 35 |
| 3.9 Análise estatística | 36 |
| 4. RESULTADOS | 36 |
| 5. DISCUSSÃO | 39 |
| 6. CONCLUSÃO | 45 |
| 7. REFERÊNCIAS | 46 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1 - Processo de formação do carvão | 16 |
| Figura 2 - Mineração a céu aberto (A) e subterrânea (B) em SC no ano de 2014..... | 16 |
| Figura 3 - Ilustração da cristalização dos evaporitos estudados. Tais minerais foram coletados em Drenagens de Minas de Carvão com pH aproximadamente entre 2,12 e 2,49..... | 22 |
| Figura 4 - Típicas precipitações de minerais secundários sobre rochas presente nas Drenagens de Minas de Carvão do estado de SC, snedo (A) hidróxidos de Fe majoritariamente e (B) sulfatos de Fe, Al, Ca e fases amorfas majoritariamente..... | 23 |
| Figura 5 - Demonstração entre distintas formações mineralógicas..... | 24 |
| Figura 6 - Lâmina teste de cometa em sangue de peixes..... | 26 |
| Figura 7 - Localização da área de estudo contendo a Drenagens de Minas de Carvão e o rio Rocinha onde foram coletados os evaporitos..... | 30 |
| Figura 8: Fluxograma ensaio de redução do metil tetrazólio..... | 32 |
| Figura 9 - Cálculo de viabilidade celular..... | 32 |
| Figura 10: Fluxograma Ensaio Cometa (EC)..... | 33 |
| Figura 11: Fluxograma Micronucleo..... | 34 |
| Figura 10: Fluxograma Ensaio Cometa (EC)..... | 33 |
| Figura 11: Fluxograma Micronucleo..... | 34 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1- Minerais e seus produtos após completa oxidação..... | 20 |
| Tabela 2- Minerais e composição química dos evaporitos..... | 22 |
| Tabela 3: Resultados Difração de Raio X (Evaporitos 1 e 2)..... | 37 |
| Tabela 4 :Conteúdo de elementos inorgânicos presente nos filtros (ng/cm ²)..... | 37 |
| Tabela 5 -Valores médios (média ± desvio padrão) obtidos a partir do ensaio Cometa | 38 |
| Tabela 6 -Valores médios (média ± desvio padrão) obtidos a partir do teste de Micronúcleo | 39 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, possui mais de 8,5 milhões de Km² e uma grande diversidade de terrenos e formações geológicas, conferindo-lhe uma grande diversidade de minérios. A mineração de carvão, no sul do Brasil, teve início no ano de 1855, e hoje é uma das fontes de energia mais exploradas pelas indústrias siderúrgicas e termoelétricas. Segundo a ABCM (2012). Desde então, muitos avanços tecnológicos foram se tornando possíveis para a extração do minério e hoje o carvão se tornou uma das principais fontes de energia para as termoelétricas distribuídas no sul do Brasil.

Atualmente, a maior reserva de carvão, com aproximadamente 28,8 bilhões de toneladas, está localizada no estado do Rio Grande do Sul. Na sequência, encontram-se os acervos de Santa Catarina e do Paraná, com números próximos a 3,4 bilhões e 100 milhões de toneladas, respectivamente. Somente no estado de Santa Catarina são extraídos mais de 6 milhões de toneladas ao ano (Mendonça Filho, 2010).

O carvão produzido em Santa Catarina, é utilizado principalmente para a geração de energia elétrica ou termoelétrica (ABCM, 2012) e, de acordo com dados da International Energy Agency (IEA) o carvão é a fonte mais utilizada para a geração de energia elétrica do mundo, respondendo por cerca de 41% da produção total, sendo que a principal restrição ao uso do carvão é devido ao grande impacto socialmente provocado durante a ocorrência dos processos de extração e consumo.

O processo de formação do carvão, segundo Mendonça Filho (2010) dá-se em condições onde o clima controla a produção de material vegetal e onde o ambiente sedimentar controla a umidade do ar, acidez, atividade bacteriana, disponibilidade de nutrientes e decomposição química. Em seguida, o material inorgânico sintetizado, atua como isolador do material orgânico formado, auxiliando no processo de compactação e permitindo a evaporação de matérias voláteis com a ajuda dos condicionantes: tempo, pressão e temperatura. Após este processo, este material é transformado em carvão através da carbonização, ou seja, a massa vegetal acumulada e soterrada sofre transformação gradual inicialmente a partir de processos

bioquímicos e posteriormente por processos geoquímicos (Cutruneo et al., 2014; Oliveira et al., 2013; Oliveira et al., 2012a,b).

Para um bom desempenho durante sua utilização o carvão brasileiro precisa passar por um processo de beneficiamento, que consiste na redução da matéria inorgânica, tais como solos, sulfetos, rochas e outras impurezas de baixo poder calorífico existentes no carvão, a fim de melhorar sua qualidade (Cutruneo et al., 2014).

Os principais impactos socioambientais, causados pela extração de carvão no Brasil, decorrem da sua mineração e, afetam principalmente a atmosfera, os corpos hídricos, o solo e o relevo das áreas circunvizinhas. A atividade de mineração provoca impactos no meio ambiente, seja no que diz respeito à exploração de áreas naturais ou mesmo na geração de resíduos (Dias et al., 2014; Martinello et al., 2014; Sanchís et al., 2015; Silva et al., 2009). Outro fator importante e um dos principais impactos ambientais, é a formação das drenagens ácidas, que se formam através da oxidação dos sulfetos de ferro, presentes nas minas de carvão. Tal impacto, por ser onde se insere a presente dissertação, será detalhado mais adiante.

Outra fonte de poluição é a emissão de óxido de enxofre, óxido de nitrogênio, monóxido de carbono e outros poluentes na atmosfera que ocorre pela abertura de poços de acesso aos trabalhos de lavra, manuseio de máquinas, equipamentos e pelo próprio corpo do minério (Borm, 1997).

Além disso, o processo de beneficiamento do carvão gera rejeitos sólidos, que de forma semelhante são depositados no local dessas atividades, dando origem a extensas áreas cobertas de rejeitos líquidos, os quais são posteriormente despejados em barragens de rejeitos ou diretamente em cursos de água (White & Claxton, 2004).

Todas essas atividades geram resíduos que podem ser potencialmente tóxicos aos seres vivos, às células e ao genoma. Os agentes que apresentam esta capacidade de alterar o DNA em sua forma, estrutura ou sequência são chamados agentes genotóxicos e a área envolvida em identificar e analisar a ação destes agentes é chamada genética toxicológica (genotoxicidade) (Tice, 2000).

Devido à composição do carvão e seus derivados, o alvo de muitas pesquisas na atualidade está relacionado à investigação da genotoxicidade deste material. Para este intuito, o uso de diferentes testes biomarcadores tem permitido a identificação dos xenobióticos potencialmente tóxicos ao genoma.

Como exemplo de testes biomarcadores, o ensaio Cometa, vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens, quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Tal análise combina a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras no DNA, com a utilização de poucas células e corresponde a um ensaio citogenético. As vantagens dessa técnica incluem a sensibilidade na detecção de dano no DNA; a coleta de dados em nível de célula individual; o uso de um número pequeno de células para a análise e a possibilidade de aplicação em qualquer população de células eucarióticas; e principalmente a rapidez de resultados (importante para diagnósticos clínicos) (Tice, 2000).

Outro ensaio também muito utilizado, é o Teste de Micronúcleos (MN), que envolve a quantificação de micronúcleos que são pequenos corpúsculos similares em estrutura ao núcleo, formados por parte de cromossomos ou cromossomos inteiros que foram perdidos na mitose, decorrente de quebras ou problemas de fuso. Outros parâmetros como pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares também são avaliados. Pontes nucleoplasmáticas ocorrem quando os centrômeros dos cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são tracionados para polos opostos da célula durante a anáfase, já o broto nuclear é considerado um marcador de instabilidade genômica (Stich & Rosin, 1983).

Desta forma, este trabalho consiste numa adequada caracterização geoquímica e na avaliação genotóxica de amostras de minerais cristalizados sobre rochas presentes em drenagens de mina de carvão, coletadas no estado de Santa Catarina, a qual possui um amplo distrito carbonífero com, aproximadamente, 1850km².

1.1 Problema

Segundo a ABCM (2012), são extraídos mais de 6 milhões de toneladas ao ano de carvão no estado Catarinense, ocasionando grandes impactos, durante sua extração e pós beneficiamento. Devido aos problemas ocasionados pela mineração de carvão, é necessário avaliar e monitorar o impacto gerado por esta atividade, avaliando a real toxicologia dos distintos compostos formados, durante e após a extração do minério, fazendo com que essa atividade, de grande importância, seja mais sustentável.

Em todo o mundo, tanto a composição das drenagens de mina de carvão, assim como os resíduos gerados pelo beneficiamento do mesmo apresentam uma composição geoquímica bem variada (Hower et al., 2013; Quispe et al., 2012; Ribeiro et al., 2010, 2013; Saikia et al., 2014, 2015; Silva et al., 2012). Um dos principais e mais danosos componentes químicos deste beneficiamento são os materiais sulfetados extraídos junto do carvão mineral. Estes compostos devido a sua composição e, exposição ao intemperismo, geram, na maioria das vezes, ácido sulfúrico quando em contato com oxigênio e água, acabam contaminando os recursos hídricos e, como consequência, acabam solubilizando os elementos dispostos nas pilhas de rejeitos de beneficiamento do carvão. Assim, essa solubilização altera as características físico-químicas dos recursos hídricos (IBAMA, 2006).

A avaliação toxicológica destes resíduos é uma ferramenta efetiva para propósito de distinguir diferentes graus de danos ambientais e a saúde humana, pois avalia os impactos desencadeados pela mineração, buscando disponibilizar soluções para minimizar as problemáticas ambientais existentes e contribuir para os processos de reabilitação das áreas degradadas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Realizar um adequado estudo geoquímico de minerais cristalizados sobre as rochas presentes em águas ácidas e, posteriormente, obter a avaliação do potencial genotóxico. Com isso, dar-se-á início a diferenciação de potenciais toxicológicos, dado que, tal como citado anteriormente, os compostos presentes na mineração e utilização

do carvão mineral são variáveis, devendo assim serem melhor investigados tanto técnico como cientificamente.

1.2.2 Objetivos Específicos

Entre os principais objetivos deste projeto de dissertação de mestrado estão:

- 1) Caracterizar mineralogicamente e quimicamente as amostras de minerais cristalizados sobre rochas presentes em drenagens de minas de carvão, coletadas ao longo do Rio Rocinha localizado no estado de Santa Catarina através do método de Difração de raio-X e PIXE;
- 2) Avaliar o potencial genotóxico das amostras de minerais cristalizados sobre rochas presentes em drenagens de minas de carvão através do ensaio Cometa em linhagem de células V79;
- 3) Avaliar o potencial citotóxico e mutagênico das amostras de minerais cristalizados sobre rochas presentes em drenagens de minas de carvão através do Teste de Micronúcleos em linhagem de células V79.

1.3 JUSTIFICATIVA

O carvão mineral é uma das rochas mais complexas da natureza, sendo que em determinadas circunstâncias alguns elementos geologicamente raros apresentam elevadas concentrações, como é o caso do urânio e germânio, além disso, através do aumento do uso de carvão, o impacto na saúde humana devido a exposição à oligoelementos potencialmente perigosos, liberados nos cursos d'água, no transporte e na combustão tornou-se uma grande preocupação (Jones & Gill, 1984).

No total, Santa Catarina dispõe de 14 minas de carvão (ABCM, 2012). Considerando o grande volume de rejeitos gerados, as bacias hidrográficas e o meio ambiente, ao redor destas minas de carvão, vêm passando por um processo de degradação ambiental incontrolável, pois o resíduo gerado pelo beneficiamento de carvão continua reagindo mesmo em minas já seladas, dando origem a um grande desequilíbrio de fauna e flora da área ao seu redor. Esse desequilíbrio é gerado pela degradação do solo e formação das drenagens ácidas, que por sua vez são formadas

através do contato da água com os resíduos de beneficiamento de carvão. Tais drenagens estão entre os piores impactos ambientais que o estado de Santa Catarina possui nos dias atuais, devido aos seus baixos potenciais hidrogeniônicos de aproximadamente 2,0. Estes efluentes se caracterizam como altamente ácidos, ou seja, acabam tornando todos os minerais presentes nos resíduos de beneficiamento de carvão solúveis no mesmo, o que afeta diretamente os recursos hídricos dos rios de Santa Catarina, que em seu fundo apresentam uma manta de lodo altamente poluidora devido a grandes quantidades de elementos potencialmente tóxicos como As, Cd, Pb, Zn entre outros (Levandowski, 2009).

Essas e muitas outras implicações, exigem uma grande necessidade de investigar e biomonitorar o potencial genotóxico dos resíduos de beneficiamento de carvão, para que possa ser possível propor uma forma de contenção ou tratamento dos mesmos, pois estes resíduos de beneficiamento são gerados em grandes proporções e acabam ocasionando um enorme desequilíbrio ambiental (Levandowski, 2009).

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1 Carvão Mineral

O carvão é um composto orgânico que se forma através da compactação, durante milhares de anos, de material vegetal. Essa compactação se dá devido aos acúmulos que ocorrem em determinadas condições como, por exemplo: pressão e temperatura em um ambiente anaeróbico (Figura 1). Este ambiente pode ser caracterizado como pântano ou várzea, o qual permite que uma grande parte de matéria seja acumulada e não totalmente decomposta, sendo essa matéria tanto de característica orgânica ou inorgânica (Oliveira et al., 2012a, 2013). Este carvão obtido através da compactação é formado por uma grande parcela de carbono, oxigênio, enxofre, silício e outros elementos rochosos associados (Levandowski, 2009).

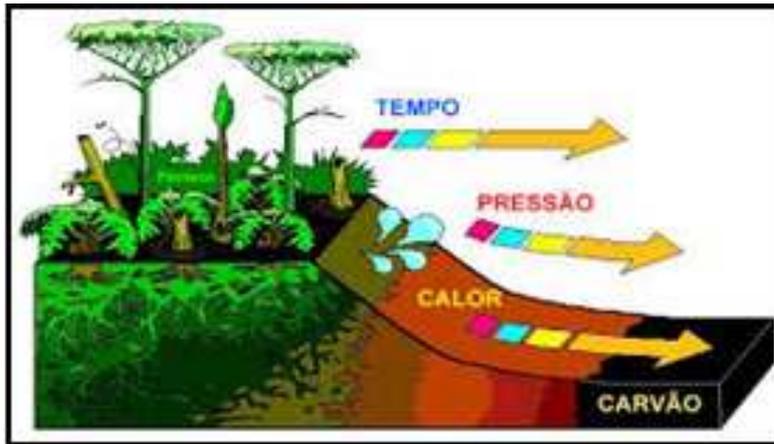


Figura 1 - Processo de formação do carvão.

Fonte:<http://geoninho.blogspot.com.br/>

Os principais métodos de mineração de carvão no Brasil podem ser separados em dois grupos: métodos de lavra (Figura 2A) a céu aberto e métodos de lavra subterrânea (Figura 2B). O primeiro grupo é essencialmente representado pelos métodos de lavra em tiras (*stripping mining*), método de lavra de descobertura com *dragline* (*dragline stripping method*), métodos de lavra em bancadas/escavadeiras (caminhões) e método de lavra de carvão em blocos de combinação trator (*scraper*). O segundo método o de lavra subterrânea é a constituído pelos métodos de câmaras e pilares (*room and pillar*) e método de lavra de carvão com caimento de teto (*longwall and shorthwall*) (Bullock, 1982).



Figura 2 - Mineração a céu aberto (A) e subterrânea (B) em Santa Catarina no ano de 2014. **Fonte:** Autoria Própria

No Rio Grande do Sul, a mineração de carvão está concentrada em lavras do tipo a céu aberto e, secundariamente em subsolo, e em Santa Catarina os principais trabalhos se desenvolvem em subsolo, dado que maior parte da mineração a céu aberto já esgotou. Tal fato, dificulta ainda mais a recuperação das áreas, dado que com o passar do tempo poderá haver episódios de combustão espontânea como os reportados por Dias et al., (2014), além de drangens ácidas.

O carvão mineral brasileiro apresenta altos teores de impurezas como sulfetos de ferro e elevadas proporções de solo. Devido ao alto teor destas impurezas, o carvão se torna na maioria dos casos, inviável para utilização nas usinas termoelétricas devido a dificuldade de padronizar este carvão para que ele se apresente dentro dos parâmetros de operação nas usinas. O processo de beneficiamento do carvão realizado pelas carboníferas de Santa Catarina gera cerca de 60-70% do rejeito que é disposto em depósitos (Bullock, 1982), muitas das vezes ineficientes (Dias et al., 2014; Cutruneo et al., 2014; Oliveira et al., 2013). De fato mais de 300 milhões de toneladas deste rejeito apresenta vários níveis de concentração de sulfetos e significativas quantidades de elementos potencialmente danosos (Jones & Gill, 1984).

2.2 O Processo de Beneficiamento do Carvão Mineral

A mineração carbonífera Sul Brasileira, em sua unidade industrial, beneficia carvão mineral *run of mine* (bruto) com a finalidade de produzir carvões energéticos com maior poder calorífico, objetivando sua comercialização.

O carvão apresenta uma alta gama de propriedades físicas e químicas que interferem na sua utilização para determinados fins dentro das indústrias. As argilas e o quartzo são os principais responsáveis pelas cinzas geradas após a combustão dos carvões, e tanto a pirita como a marcassita carbonosas, pelos altos teores de enxofre (Oliveira et al., 2012a, 2013). Para se obter o carvão mais próximo do necessário à utilização em processos industriais, o mesmo passa por um processo chamado de "beneficiamento", que prepara este material fazendo com que ele atenda as necessidades do cliente e seja constituído por material rico em carbono e o mais homogêneo possível. Desta maneira, amostras de carvão são retiradas diretamente

das minas, para determinar o tratamento adequado que deve ser realizado (Finkelman 1994). Os processos de beneficiamento do carvão mineral são classificados, de forma geral, de acordo com a sua granulometria (Schubert, 1989), sendo organizados da seguinte forma: (1) beneficiamento de ultrafinos de carvão, devido à fina granulometria desta faixa de materiais abaixo de 0,1mm; (2) beneficiamento de finos de carvão, este beneficiamento trabalha com granulometrias entre 0,1mm e 2mm; (3) beneficiamento de grossos de carvão são processos que envolvem uma granulometria entre 2mm até 50mm e por último; (4) beneficiamento grosseiros de carvão que trabalham com granulometrias superiores a 50mm (Kelly & Spottiswood 1982; Cutruno et al., 2014).

Além disso, existem três tipos de processos de beneficiamento que podem ser realizados nas empresas: (a) o dimensionamento, controlado por um processo de trituração e peneiramento; (b) o aumento do valor de aquecimento, através da remoção de cinza incombustível e rocha por separação por gravidade; (c) a remoção ou controle do mineral indesejável e de componentes químicos como (enxofre, sódio e oligoelementos) por uma combinação de separação por gravidade e mistura (Cutruno et al., 2014).

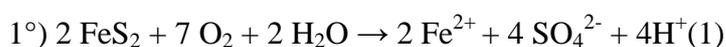
Durante todo o processo de beneficiamento, pode ser seguido um protocolo padrão para definir as etapas do procedimento de beneficiamento de carvão e a geração dos seus coprodutos e rejeitos, porém um dos principais impactos gerados pelos resíduos gerados durante esse processo de beneficiamento, é a geração de drenagem de mina de carvão. As drenagens de mina de carvão, são as principais fontes de contaminação do solo e dos recursos hídricos, juntamente com a poluição atmosférica gerada pelas partículas ultrafinas durante a queima do carvão e do processo beneficiamento e são responsáveis pela maior parte da poluição ambiental nos estados produtores do sul do Brasil (Jones & Gill, 1984).

2.3 Drenagens de Mina de Carvão (DMC)

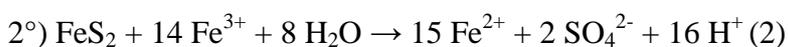
No presente trabalho foram estudadas duas DMC, que afetam diretamente o Rio Rocinha, principal formador do Rio Tubarão, em SC. Tais drenagens e rio, além de conter elevadas concentrações de elementos dissolvidos e elevada carga protônica, também contêm elevadas concentrações de compostos orgânicos derivados do carvão

mineral, como por exemplo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A principal formação de tais drenagens é o processo de oxidação de sulfetos, processo este que pode ser acelerado pela movimentação de matérias sólidos, característicos dos processos de lavra e beneficiamento (Oliveira et al., 2013; Ribeiro et al., 2010; Saikia et al., 2014), atividades de escavação e erosão de rochas que acabam alterando as condições de permeabilidade do ar, facilitando o contato do oxigênio com a superfície do material reativo (Ritchie, 1994).

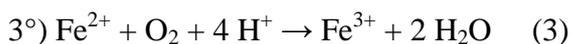
A oxidação dos sulfetos é catalisada por Fe^{3+} e processos microbiológicos que atuam principalmente quando o pH atinge valores inferiores a 3,5, onde a reação de acidificação das águas e oxidação dos sulfetos é inicialmente uma reação cinética lenta (Ritchie, 1994; Silva et al., 2013, 2011).



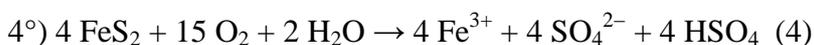
o próprio ferro férrico (Fe^{3+}), em si um oxidante poderoso de pirita em condições altamente ácidas, que reage com a pirita de acordo com a seguinte reação:



Em seguida, o ferro ferroso (Fe^{2+}) liberado na solução é quimicamente oxidado em ferro férrico pelo oxigênio dissolvido presente na água:



Tendo em mente as reações parciais 1-3, pode-se considerar como a reação global de oxidação:



Embora a pirita seja uma das mais citadas, quando se fala sobre drenagens ácidas, vários outros sulfetos são encontrados em rejeitos de mineração, observado na Tabela 1.

Tabela 1- Minerais e seus produtos após completa oxidação (Fonte: www.scielo.br)

| Mineral | Espécies aquosas após oxidação completa | Possíveis minerais secundários formados a pH neutro e após completa oxidação |
|--|--|---|
| Pirita FeS ₂ | Fe ³⁺ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de ferro e sulfatos; Gipsita |
| Marcassita FeS ₂ | Fe ³⁺ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de ferro e sulfatos; Gipsita |
| Calcopirita Cu ₂ S | Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de ferro e sulfatos; Hidróxidos de cobre e carbonatos; Gipsita |
| Calcocita Cu ₂ S | Cu ²⁺ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de cobre e carbonatos; Gipsita |
| Bornita Cu ₂ FeS ₄ | Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de ferro e sulfatos; Hidróxidos de cobre e carbonatos; Gipsita |
| Arsenopirita FeAsS | Fe ³⁺ , AsO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de ferro e sulfatos; Arsenatos de ferro e cálcio; Gipsita |
| Molibdenita MoS ₂ | MoO ₄ ²⁻ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de ferro e sulfatos; Molibdatos; Óxidos de molibdênio; Gipsita |
| Esfalerita ZnS | Zn ²⁺ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de zinco e carbonatos; Gipsita |
| Galena PbS | Pb ²⁺ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de chumbo; Carbonatos; Sulfatos; Gipsita |
| Cobalita CoAsA | Co ²⁺ , AsO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , H ⁺ | Hidróxidos de cobalto; Carbonatos; Arsenatos de Ferro e cálcio; Gipsita |

As DMCs, existentes em volumes expressivos no estado de Santa Catarina, são potencialmente poluidoras dos recursos hídricos, sejam superficiais ou subterrâneos. Entretanto, existem também contaminações naturais do meio ambiente por metais pesados, pois as diversas formações de rochas podem possuir metais em suas constituições, além do que, existem as concentrações anômalas de diversos minerais, que constituem as jazidas (Krebs, 2004).

No passado, a exploração de carvão mineral na Bacia Carbonífera de Santa Catarina, era feita sem maiores cuidados com o meio ambiente, com disposição desordenada de pilhas de rejeitos sem proteção, as quais contêm em sua composição química principalmente ferro e manganês, constituindo-se em importantes fontes de metais pesados solubilizados (Krebs, 2004). Os resultados desse feitos são reflexados hoje no alto custo para a adequada recuperação das áreas carboníferas.

Além disso, havia o lançamento indiscriminado de efluentes brutos de beneficiamento e drenagem de mina diretamente nos cursos d'água. A água com grande carga de acidez e pH muito baixo, exibe desta forma a ocorrência de metais pesados solubilizados, constituindo a DMC (Krebs,2004).

2.4 Evaporitos

Apesar de todos os corpos d' água na superfície terrestre, e pequenos aquíferos apresentarem uma parte de sais minerais dissolvidos, são nas DMC, onde encontram-se as maiores concentrações de minerais altamente tóxicos e danosos ao ambiente. O processo de formação dos evaporitos ocorre pela evaporação da água, que teve contato com os resíduos do beneficiamento do carvão ou, mesmo com veios subterrâneos de carvão mineral, e como consequência deste fenômeno, os elementos dissolvidos acabam formando minerais, através da cristalização sobre alguma superfície-. Diferente de algumas formações de evaporitos no meio ambiente, esta formação especialmente caracteriza-se por ser um processo muito mais agressivo e com altos danos ao ambiente devido as grandes cargas de elementos com alto poder poluidor presente nestas águas de drenagens (Boggs, 2006).

Para que o processo de evaporação e precipitação deste material ocorram, o corpo de água deve estar em um ambiente restrito, onde a entrada de água presente nesse ambiente permanece por um período abaixo da taxa líquida de evaporação (Hogan, 2011). A figura 3 ilustra alguns pontos onde ocorrem a formação de evaporitos na área de estudo.



Figura 3 - Ilustração da cristalização dos evaporitos estudados, drenagem de mina de carvão com pH 2,12, que afeta o rio Rocinha, SC. **Fonte:** Autoria Própria.

Geralmente este ambiente caracteriza-se por um ambiente árido, com uma pequena bacia e alimentado por uma entrada limitada de água (Boggs, 2006).

Os principais grupos minerais que formam a composição dos evaporitos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Minerais e composição química dos evaporitos(Fonte: www.scielo.br)

| Classe dos Minerais | Nome do Mineral | Composição Química |
|---------------------|---|---|
| Cloretos | Halite, Sylvite, Carnallite, Langbeinite, Polyhalite, Kainite | $\text{NaCl}, \text{KCl}, \text{KMgCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}, \text{K}_2\text{Mg}_2(\text{SO}_4)_3, \text{K}_2\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{SO}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}, \text{KMg}(\text{SO}_4)\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ |
| Sulfetos | Anhydrite, Gypsum, Kieserite | $\text{CaSO}_4, \text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}, \text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ |
| Carbonatos | Dolomite, Calcite, Magnesite | $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2, \text{CaCO}_3, \text{MgCO}_3$ |

2.5 Consequências ambientais da mineração

Uma das principais consequências ambientais geradas pela mineração de carvão está diretamente ligada às DMC e aos métodos de beneficiamento utilizados, bem como as próprias características das camadas de carvão como alto teor de sulfetos, baixos poder calorífero etc. No entanto, a grande vilã que confere abrangência regional aos problemas gerados pela mineração de carvão é a formação da pirita e seu poliformo a marcasita (FeS_2), formadoras das drenagens ácidas de mina (Göthe, 1989). Cabe destacar que nas DMC são formados 2 grupos de minerais por formação geoquímica completamente distintos, sendo: (1) evaporitos anteriormente explicados e (2) precipitação de minerais secundários como sulfatos, hidróxidos de Fe, Al, Ca, Mg, Mn entre outros. A figura 4 ilustra rochas contendo massivas precipitações de minerais secundários, o que não foi alvo na presente dissertação.



Figura 4 - Típicas precipitações de minerais secundários sobre rochas presente nas drenagens de mina de carvão do estado de Santa Catarina, sendo (A) hidróxidos de Fe majoritariamente e (B) sulfatos de Fe, Al, Ca e fases amorfas majoritariamente.

Fonte: Autoria Própria

A figura 4A demonstra a formação de distintas fases contendo hidróxidos de ferro majoritariamente. Entretanto facilmente se pode observar que abaixo da camada

mais avermelhada, há a presença de sulfatos de Fe, Al, Ca entre outros elementos, o que indica que o Rio Rocinha possui uma geoquímica complexa que varia de acordo com fatores climáticos, podendo ter distintas fases mineralógicas sendo formadas durante todo o ano. Isso comprova ainda mais, a real necessidade de estudos toxicológicos para os distintos compostos, afinal a solubilidade destes grupos mineralógicos são completamente distintas, além de que os minerais possuem distintas capacidades de adsorção de elementos potencialmente tóxicos como Hg, Cd, Pb, As, Cr, entre outros.

Afim de facilitar a demonstração da complexidade geoquímica da área de DMC. A figura 5 mostra a complexibilidade geoquímica de uma DMC pois nela é possível visualizar facilmente a diferença entre minerais formados via precipitação e evaporitos.

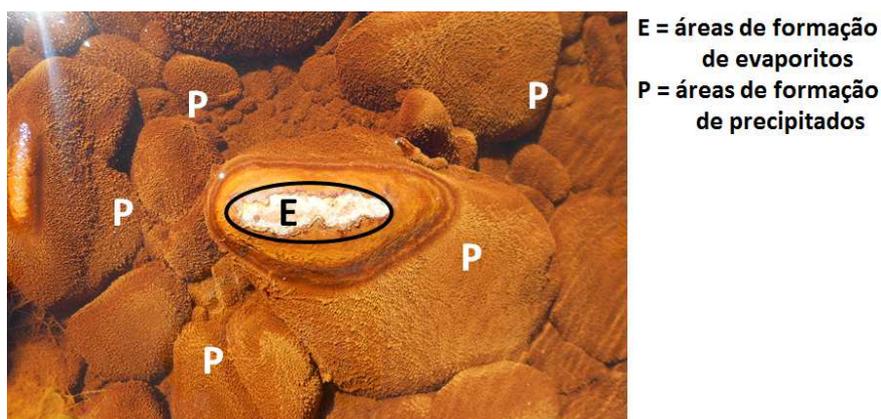


Figura 5 - Demonstração entre distintas formações mineralógicas. **Fonte:** Autoria Própria

O alto teor de enxofre piritoso no carvão Catarinense foi explicado por Göthe (1989), constatando que nos carvões brasileiros brutos, aumenta-se a concentração desse elemento, do sul para o norte, com cerca de 1% no Rio Grande do Sul, e atingindo de 3 a 8% em Santa Catarina. Göthe (1989) ainda destaca o que o alto teor de enxofre piritoso é proveniente das altas vazões de água drenadas diretamente das minas de carvão, já que cerca de 75% do carvão minerado vira rejeito.

No entanto outros fatores como a combustão de carvão em indústrias e termelétricas causam também graves impactos socioambientais, devido à emissões de material particulado e de gases poluentes para a atmosfera, dentre os quais se destacam a volatilização de elementos danosos como o Hg, As e Se além do dióxido de enxofre (SO₂) e os óxidos de nitrogênio (NOx).

Diversos estudos confirmam que a quantidade de enxofre liberado durante o processo de combustão de carvão são maiores do que a de outros combustíveis fósseis (Isobeet al., 2005). Esses gases são os principais responsáveis pela formação da chamada chuva ácida, que provoca a acidificação do solo e da água e, constante alterações na biodiversidade, entre outros impactos negativos, como a corrosão de estruturas e monumentos (Göthe, 1989)

2.6 Ensaio de Genotoxicidade

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA produzindo alterações em sua estrutura ou função, danificando processos de reparo celular, gerando alterações em estruturas cromossômicas ou ainda modificando processos celulares dependentes da estabilidade genética (Tice et al., 2000).

Os agentes genotóxicos que tem como consequência a alteração da estrutura e função da molécula de DNA são chamados também de agentes mutagênicos, pois causam mutações. Mutações são fontes de variabilidade genética de uma população sendo, portanto, fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, podem causar doenças tanto nos indivíduos como nos seus descendentes, dependendo da quantidade, do tipo e local onde ocorrem e além disso, podem alterar o balanço do ecossistema (Tice et al., 2000).

Nas populações, as mutações podem aumentar a incidência de câncer, doenças hereditárias e do coração, bem como aumentar a virulência de patógenos. Os compostos mutagênicos encontram-se distribuídos nos ecossistemas como água, ar e solo e são transferidos e acumulados através das cadeias tróficas, podendo causar danos genéticos ou efeitos genotóxicos nos indivíduos ou nas populações expostas (Tice et al., 2000).

Desta forma, a avaliação do risco genotóxico de amostras de minerais cristalizados sobre rochas presentes em drenagem de mina de carvão envolvendo estudos *in vitro* a partir do uso de biomarcadores de genotoxicidade clássicos como o ensaio Cometa e o teste de Micronúcleos, permitirá compreender os processos envolvidos e a interação das substâncias químicas com a célula no intuito de estabelecer prioridades e formas de intervenção efetiva para minimizar os possíveis efeitos genotóxicos à biota.

2.6.1 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa (EC) (“Single Cell Gel electrophoresis”) é uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA em células individuais de mamíferos, apresentando algumas vantagens: permite a obtenção de grande quantidade de dados em células individuais, necessita de um número extremamente pequeno de células (<10.000), tem grande sensibilidade e pode ser realizado virtualmente com qualquer tipo de célula de eucarioto (Singh et al, 1988).

Neste ensaio, as células são aplicadas em um gel de agarose sobre uma lâmina de microscópio e a seguir lisadas e submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino. A presença de quebras simples, sítio lábeis alcalinos e *crosslinks* resultantes da ação de compostos genotóxicos, altera a estrutura do DNA das células, que normalmente está enrolado e fortemente compactado, causando relaxamento em partes da molécula que migra em direção ao pólo positivo. Desta forma, após aplicação de corantes específicos, pode-se visualizar em microscópio a migração do DNA, que se assemelha a um cometa (Singh et al, 1988) (Figura 6).

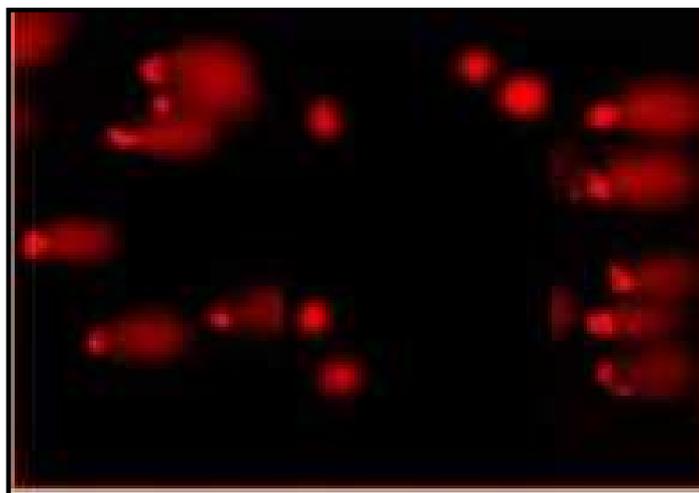


Figura 6 - Lâmina teste de cometa em sangue de peixes.

Fonte: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>

2.6.2 *Teste de micronúcleo*

As consequências possíveis da presença de agentes genotóxicos no ambiente podem ser avaliadas por meio do estudo de danos genéticos em culturas de células, em organismos sentinela e/ou populações humanas. As técnicas citogenéticas têm sido muito utilizadas para a determinação dos efeitos causados por agentes genotóxicos presentes no ambiente no DNA de diferentes linhagens celulares e de organismos expostos. Um dos testes utilizados à avaliação da genotoxicidade é o teste de Micronúcleos (Vilella et al 2003)

Micronúcleos são pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico, após a separação das cromátides no processo mitótico dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos de cromossomos, mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo, este também pode constituir um pequeno núcleo individual chamado de micronúcleo (Fenech, 2007). Desta forma, os micronúcleos são estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda de material genético. Portanto o teste de Micronúcleo detecta a mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (Vilella et al 2003).

Essa mutagênese cromossômica também pode ser identificada na forma de pontes nucleoplasmáticas que ocorrem quando os centrômeros dos cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são tracionados para pólos opostos da célula durante a anáfase (Fenech et al, 2003). A análise dessa alteração permite a possibilidade de avaliar eventos de quebra/ translocação sem a necessidade de utilizar marcadores de

cinetócoro ou centrômero, favorecendo uma visão mais complexa do possível dano cromossômico.

Outro marcador de instabilidade genômica é o broto nuclear (Stich & Rosin, 1983). A origem desta estrutura ainda não está completamente esclarecida. Acredita-se que represente uma amplificação gênica ou falha no sistema de reparo do DNA (Fenech, 2000), além de sugerir a capacidade nuclear de detectar excessos de DNA e desencadear processos de reparação (Fenech, 2007). De acordo com Fenech (2007), a amplificação gênica pode corresponder a um evento importante na resistência celular a drogas e na progressão tumoral.

2.7 Biomonitoramento Ambiental na mineração

A mineração de carvão representa uma atividade de grande importância à economia regional, mas ao mesmo tempo é fonte de contaminação ambiental e riscos ocupacionais. Em estudos de monitoramento genotóxico com diferentes organismos realizados em minas de carvão e com o carvão e seus derivados observaram-se aumentos de danos ao DNA. Silva et al. (2000) observaram aumento do número de micronúcleos (MN) e dos níveis de danos detectados no Ensaio Cometa em *Ctenomys torquatus* (tuco-tuco) de regiões mineradoras do estado do Rio Grande do Sul, quando comparados a regiões sem carvão.

Em relação à exposição *in vitro* alguns trabalhos demonstraram o efeito tóxico do carvão e seus derivados em diferentes linhagens celulares (Léonard et al., 1984; Granella & Clonfero, 1992; Gu et al., 1992; Stierum et al., 1993). Em estudo realizado com trabalhadores de minas de carvão a céu aberto, bem como com aqueles de escavações, foi demonstrado aumento no índice de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e MN (Srám et al., 1985) Também foi observada indução de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e MN em trabalhadores de usinas termoeletricas, que utilizam o carvão como fonte de energia (Srám et al., 1985).

Estudos realizados com em roedores selvagens da espécie (*Rattus rattus* e *Mus musculus*) em uma área de mineração de carvão a céu aberto, indicaram que os mesmos apresentaram ao final do estudo, resultados que demonstraram a evidência de que a exposição ao carvão gerou lesões elevadas no DNA das células dos

roedores. Neste estudo foram avaliados três parâmetros diferentes de danos no DNA, ou seja, o índice de danos no DNA, o comprimento da migração e porcentagem de células danificadas. Todos os parâmetros avaliados apresentaram valores estatisticamente mais elevados em ratos de área de mineração de carvão em comparação com os animais controle (Grethel et al., 2007)

Outros estudos de biomonitoramento ambiental que visam a avaliação genotóxica de rejeitos de carvão também têm apresentado resultados positivos, ou seja, resultados que expressam danos causados ao DNA. Um estudo realizado em caracol terrestre da espécie *Helix aspersa*, que tratou de avaliar os danos causados a estes animais quando expostos a uma camada fina de rejeitos de carvão e quando alimentados com alfaces cultivadas em um área de rejeitos, revelou que esses caracóis apresentaram altos danos no DNA comparados ao grupo controle que foi alimentado apenas por alfaces orgânicas. Este resultado se deu devido as grandes concentrações de metais pesados encontrados nos rejeitos de beneficiamento de carvão (Leffa et al., 2010).

Em relação a estudos realizados na cobertura vegetal destas áreas de mineração de carvão destacam-se os trabalhos desenvolvidos através da utilização de uma planta chamada de *Baccharis trimera* mais conhecida como carqueja. Nesses trabalhos, células V79 e de linfócitos humanos foram expostas ao extrato aquoso da planta, onde se avaliou a genotoxicidade da carqueja nativa exposta ao carvão e as emissões a partir de um usina termelétrica. Os resultados confirmaram o potencial genotóxico do extrato aquoso da *B. Trimerica* devido a presença de contaminantes do carvão absorvidos pela planta (Menezes et al., 2015)

Desde os anos de 1950, globalmente existem mais de cinco mil artigos científicos que reportam a composição geoquímica dos carvões, DMC, resíduos da mineração em geral, entretanto os artigos que estudam a toxicologia de tais materiais e ambientes, com adequadas ferramentas para caracterização não chegam a cinquenta. Essa realidade proporciona uma grande oportunidade para novos estudos na área de geoquímica toxicológica e/ou médica.

Embora nacionalmente tenham estudos toxicológicos referentes a processos de beneficiamento e a rejeitos de carvão, o conhecimento referente à toxicidade de material de DMC é limitado. Desta forma, o presente trabalho visa avaliar amostras

de minerais cristalizados sobre rochas presentes em DMC coletados ao longo curso do Rio Rocinha através de ensaios de genotoxicidade.

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta das amostras

As amostras de evaporitos, do presente trabalho foram coletados no estado de Santa Catarina em duas DMC situadas no trecho do Rio Rocinha (Figura 7). Os pontos de coletas foram selecionados através de coordenadas geográficas do local, obtidas através de um GPS.

Dois pontos de coletas de amostras foram selecionados: a primeira DMC de coleta do material possuía $\text{pH} = 2,17$ e a segunda DMC possuía $\text{pH} = 2,34$ (que segundo a revisão bibliográfica realizada, proporciona elevadas concentrações de cátions, ânions e elementos solúveis, além de uma elevada condutividade elétrica. Ambas DMC desembocam em trechos do rio Rocinha. Foram coletadas cerca de 100g de cada amostra e no laboratório, as amostras foram preparadas para análises posteriores, seguindo os procedimentos descritos em trabalhos anteriores sobre DMC (Silva et al., 2011, 2013).



Figura 7 - Localização da área de estudo contendo a drenagem de mina de carvão e o rio Rocinha onde foram coletados os evaporitos. **Fonte:** Autoria Própria

3.2 Quantificação dos elementos químicos (PIXE)

Para determinação dos elementos inorgânicos presentes nas amostras foi realizada a técnica PIXE. As amostras de Evaporitos foram dissolvidas em água e posteriormente filtradas em filtro de 0,45 μ m de porosidade. Esses filtros foram secos em temperatura ambiente e colocados em um suporte no interior da câmara de reação do implantador iônico. Durante todo o processo da técnica a pressão no interior da câmara de reação foi de 10⁻⁵ mbar. Os experimentos foram realizados Laboratório do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IF- UFRGS).

A cerca de 3 MV tandetron acelerador forneceu um feixe de prótons 2 MeV com uma corrente média de 5 nA para o alvo .

Os raios -X produzidos nas amostras foram detectados por um detector germânio (Ge), com uma resolução de cerca de 180 eV em 5,9 keV com alta eficiência entre 3 e 100 keV. Os espectros foram analisados com o pacote de software GUPIX e os valores foram expressos em ng/cm² (Campbell et al . , 2000).

3.3 Difração de Raio-X (DRX)

O objetivo desta técnica é a determinação semiquantitativa mineralógica, através das fases cristalinas presentes na amostra.

A difração de raio X é uma das técnicas mais amplamente usadas quando se quer estudar materiais sólidos especialmente os que possuam estrutura cristalina. Essa técnica teve início nos meados do século XX, quando se realizou experiências de difração e reflexão de raios-X em um material cristalino, permitindo amostrar a natureza eletromagnética desta radiação (Laue,1912; Bragg & Bragg, 1915).

Na atualidade, a difração de raio-X é um avanço nas análises de materiais sólidos, podendo ser aplicada em elementos mono ou policristalinos (de cristais) abaixo de 0,1mm, e outras partes de amostras formadas por cristais monofásicos de tamanho superior ao sistema monocristalino. A análise de XDR se emprega a qualquer material cristalino, e é amplamente utilizada para análises de materiais

inorgânicos, orgânicos, supercondutores, minerais, matérias corrosivos, metais, polímeros, detergentes, pigmentos, produtos farmacêuticos, cerâmicas, explosivos, etc.

Foram analisados tanto os minerais primários quanto os secundários presentes nas amostras, mediante a técnica de Difração de Raios-X de pó cristalino, determinando para isso as fases cristalinas presentes, via um difratômetro do tipo Phillips PW1820 com radiação Cu K α e um ângulo de varredura de 2 a 60° em 2 θ , porém apenas os minerais secundários servem como referência no estudo de impactos contínuos, como é o caso de áreas de minas abandonadas, devido às reações das quais se formam. As amostras foram nomeadas como Evaporitos 1 e Evaporitos 2 (Laue,1912; Bragg & Bragg, 1915).

Neste estudo, realizou-se a determinação quantitativa mineralógica. As amostras que encontravam no estado sólido e de aspecto microcristalino, em condições de temperatura ambiente. As mesmas foram inclinadas com diversos ângulos durante a medição para obter os perfis de pico otimizados para a análise, bem como para minimizar o efeito da orientação preferencial. Foram depositadas em um banco de um cristal orientado para evitar o ruído de fundo ocasionado por um suporte tipo vítreo.

Para realizar o processo de interpretação e quantificação foi usado o programa HighScore Plus – Version 3.0d, baseado em técnicas de análises para DRX de Rietveld.

3.4 Cultura Celular

Para este estudo a linhagem celular foi adquirida pelo laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). A linhagem utilizada durante o experimento foi do tipo V79 (fibroblastos de hamster chinês), a desidade de células cultivadas para a realização dos teste foi de 1×10^5 a cultura destas células foi mantida a base de DMEM, suplementada com soro fetal bovino (PBS) (10%), L glutamina (0,2mg/mL), penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (100ug/ml), mantida a 37°C em estufa, com atmosfera umidificada e com CO₂ a 5%. O processo de

tripsinização (tripsina a 0,15% e EDTA a 0,08%) em PBS foi realizado nas células quando as mesmas foram plaqueadas juntamente com meio de cultura em garrafas para cultura celular de 25 cm² para a avaliação do ensaio Cometa com incubação de 3h.

Após o tempo de plaqueamento, retirou-se a garrafa cultivada da incubadora de CO₂ a 37°C e observou-se a presença de células utilizando a ajuda de um microscópio de luz invertida. Em seguida o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com 10 mL de DPBS, posteriormente o excesso de DPBS foi removido, e foram adicionados 10 mL de TRIPSINA (a fim de provocar o “deslocamento” das células do frasco de cultivo). Homogeneizou-se, e o frasco foi colocado deitado na estufa, para que a tripsina entrasse em contato com toda a superfície celular, durante 5 minutos.

Após esse período, foram dadas algumas batidas no frasco de cultura, para que houvesse o desprendimento das células que estavam na superfície do mesmo. O volume total do frasco foi transferido para um tubo falcon com 10 mL de meio de cultura DMEM, que inativa a ação da tripsina. O tubo foi centrifugado durante 3 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi desprezado. O pellet de células formado foi ressuspensionado com 5 mL de DMEM. Homogeneizou-se no vortex e realizou-se o teste da viabilidade celular, para saber o total de células presentes na cultura e qual o volume de suspensão celular necessário para o cultivo.

3.5 Técnica da redução do metil tetrazólio (MTT)

A técnica de MTT nada mais é que um teste quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazana, produto formado pela redução de tetrazolium MTT. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial.

Após o período de incubação das células de fibroblastos de hamster chinês (V79), o meio de cultura foi retirado cuidadosamente, os poços foram lavados com PBS, e em seguida, adicionou-se 150µL/por poço de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), as placas foram incubadas

durante um período de 3h em estufa a 37°C (Boeira et al., 2001). Após o termino desta etapa o MTT foi removido, e nas placas contendo o precipitado formado foram adicionados imediatamente 100µL do solvente DMSO (Boeira et al., 2001)

A leitura da absorbância dos cristais formados, diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis, foi realizada utilizando um leitor de ELISA com comprimento de onda de 540 nm, como mostra a (Figura 8)

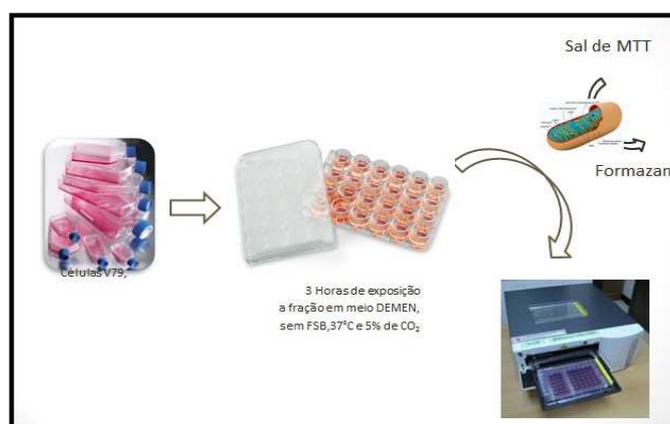


Figura 8: Fluxograma ensaio de MTT (Fonte: Autoria Própria)

Os testes foram realizados em duplicata e em seguida normalizados conforme a fórmula abaixo apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Cálculo de viabilidade celular

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Absorb. Das células das amostras} - \text{Absorb do branco}}{\text{Absorb de células controle positivo} - \text{Absorb do branco}} \times 100$$

3.6 Escolha das dosagens

Com base nos resultados de citotoxicidade obtidos a partir da técnica do MTT, as dosagens escolhidas para a realização do ensaio Cometa e do teste de Micronúcleo, foram as doses de 1 a 5 cuja a concentração inicial partiu de 0,05g e

seguinte um processo de diluição em DMEM teve a sua menor concentração em 0,00312g de amostra (Evaporitos). Os experimentos de micronúcleo e teste de cometa foram realizados em duplicata para cada concentração juntamente com os grupos controles positivo e negativo.

3.7 Ensaio Cometa

Após exposição celular de 3h utilizando diferentes concentrações das amostras, controles positivos e negativos, o ensaio Cometa foi realizado seguindo as seguintes etapas: (1) as lâminas foram pré-cobertas com agarose; (2) as amostras foram retiradas da placa e transferidas para um *eppendorf*, cada *eppendorf* contém ao total 1ml (amostra + células V79 + DMEM), posteriormente foram pegos 80µl do material do *eppendorf* e misturado com 20µl de agarose “*low melting*” essa alíquota foi misturada até ficar homogênea e distribuída nas lâminas; (3) as lâminas foram colocadas em solução de lise, onde permaneceram por 24h protegidas da luz; (4) após a lise as lâminas foram colocadas em uma cubeta contendo solução neutralizadora, por 15 minutos; (5) em seguida foram distribuídas em cuba de eletroforese horizontal, sendo cobertas por solução tampão alcalina (pH 12,6) por 20 min.; (6) a eletroforese foi realizada por 20 min. à 25 volts e uma corrente de 300 miliamperes; (7) as lâminas foram lavadas com solução neutralizadora; (8) e por fim, foram mergulhadas em etanol 100% para a fixação; (9) a coloração foi efetuada com nitrato de prata e a visualização das lâminas foi realizada em microscópio óptico com uma ampliação de 200x como mostra a (Figura 10); (10) foram avaliadas 100 células por tratamento (25 por lâmina). As células “cometa” foram classificadas de 0 (sem lesão) à 4 (totalmente lesadas), conforme o tamanho da cauda em relação a cabeça, gerando um valor único, considerado como índice de danos. Este índice podendo variar de zero (100 células x classe 0) à 400 (100 x classe 4).

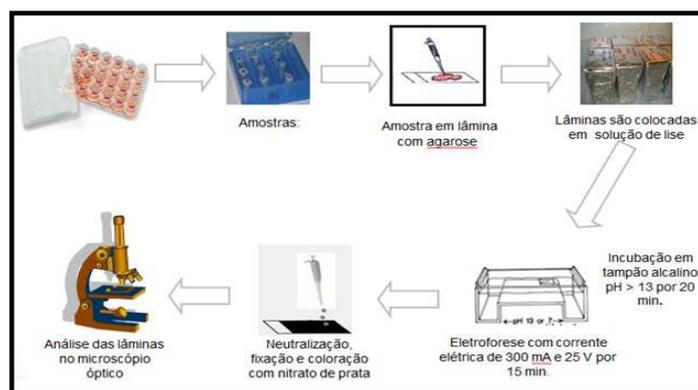


Figura 10: Fluxograma Ensaio Cometa (EC) (Fonte: Autoria Própria)

3.8 Teste de Micronúcleo

O teste de Micronúcleos foi realizado seguindo a técnica descrita por Fenech (2007), com a utilização da citocalasina B. Em placas de 24 poços as células foram semeadas e incubadas durante 24 horas. Após a exposição de 24h das cinco doses de Evaporitos 1 e Evaporitos 2 selecionadas através do resultado do ensaio de MTT, juntamente com o controle negativo e positivo, a placa contendo as concentrações e os controles, foi lavada com DPBS e colocada novamente em cultivo, para a exposição da citocalasina B por um período de 21 horas. Após a adição da citocalasina B, as células binucleadas podem ser melhores reconhecidas. Subsequentemente, as células foram lavadas novamente com DPBS e removidas da placa através do processo de tripsinização. As lâminas de Micronúcleo foram feitas pelo método da citocentrifugação, em seguida secas ao ar, fixadas e coradas com Panótico como mostra a (Figura 11).

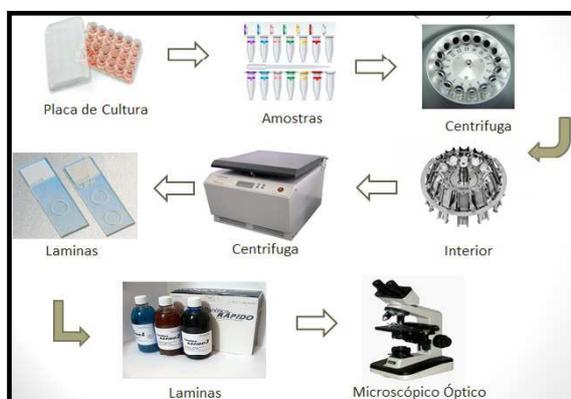


Figura 11: Fluxograma Micronucleo (Fonte: Autoria Própria)

O número total de células binucleadas com micronúcleos (BN-MN), com brotos nucleares e com pontes nucleoplasmáticas, foram determinadas de acordo com os critérios definidos por Fenech (2007).

Para cada ponto experimental, as culturas foram realizadas em triplicata. A partir de cada tratamento, 1000 células binucleadas foram avaliadas sob aumento de 400 vezes.

3.9 Análise estatística

Os procedimentos estatísticos aplicados visaram investigar a existência de associação entre níveis de alterações nucleares (índice e frequência de dano ao DNA, micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares).

Foram realizadas duas repetições do ensaio Cometa e do teste de Micronúcleos com as células tratadas e controles. Sendo assim, foram realizadas análises estatísticas das duas repetições por meio do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, com auxílio do programa GraphPad Prism 5.1.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise de DRX são descritos na tabelas 3. Tanto no Evaporitos 1 como no 2 foram encontrados melanterita, halotriquita, hematita, gipsita e halita, porém em proporções diferentes. Tais variações se devem as naturais desidratações e hidratações dos minerais, no meio ambiente, por tanto, serve para exemplificar a complexidade da composição mineralógica das amostras formadas como evaporitos. Serve ainda para demonstrar a real necessidade de se estudar as variações toxicológicas tanto dos carvões como de seus sub-produtos sejam eles primários ou secundários em meio sólidos, líquidos ou gasosos.

Tabela 3 - Resultados DRX (Evaporitos 1 e 2)

| Concentração (%) | Concentração (%) | Nome | Fórmula | Classificação |
|------------------|------------------|--------------|--|---------------|
| Evaporitos(1) | Evaporitos (2) | | | |
| 39 | 62 | Melanterita | $(\text{Fe}_{0,5}\text{Zn}_{0,4}\text{Cu}_{0,1})\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato |
| 44 | 29 | Halotriquita | $\text{FeAl}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato |
| 04 | 05 | Hematita | Fe_2O_3 | Óxido |
| 11 | 04 | Gipsita | $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato |
| 02 | 01 | Halita | NaCl | Haleta |

Em relação as análises dos elementos inorgânicos (Tabela 4), é possível destacar a presença de Na, P, S, Cl, K, Ca, Ni, Fe Cr e Zn nas amostras de Evaporitos 1 e 2 comparadas as amostras do controle negativo e ainda, um aumento significativo de P, Ca, Fe, K nas amostras de Evaporitos 1 quando comparadas as amostras de Evaporitos 2.

Tabela 4 - Conteúdo de elementos inorgânicos presente nos filtros (ng/cm²)

| Elementos inorgânicos | Controle negativo | Evaporitos 1 | Evaporitos 2 |
|-----------------------|-------------------|----------------|---------------|
| Na | ND | 3528 ± 1473* | 1327 ± 51,87 |
| P | 576,9 ± 11,52 | 1267 ± 217,8* | 535,6 ± 66,75 |
| S | ND | 1810 ± 223 | 1056 ± 41,93 |
| Cl | ND | 12756 ± 4535* | 6601 ± 1095 |
| K | ND | 1178 ± 312,9* | 683 ± 8,001 |
| Ca | 25,32 ± 28,51 | 1162 ± 468,3* | 610,7 ± 60,47 |
| Cr | ND | 29,1 ± 19,88 | 24,48 ± 5,38 |
| Fe | 1,77 ± 3,06 | 843,8 ± 177,5* | 286,1 ± 86,46 |
| Ni | 0,84 ± 0,95 | 10,54 ± 4,001* | 5,53 ± 1,81 |
| Zn | ND | 22,89 ± 6,37 | 11,24 ± 2,37 |

*Diferença significativa em relação ao grupo controle P<0,05. Teste de Kruskal-Wallis

Os resultados de genotoxicidade das amostras de minerais cristalizados (Evaporitos 1 e 2) presentes nas rochas e drenagens de minas de carvão são apresentados nas Tabelas 5 e 6. As amostras exibiram um potencial genotóxico, pois as duas dosagens com maiores concentrações de Evaporitos 1 apresentaram aumento no índice de danos comparado ao grupo controle negativo ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente) enquanto a maior dose do Evaporitos 2 apresentou aumento no índice de danos ($P < 0,05$) comparado ao grupo controle negativo. O mesmo foi observado para a frequência de danos, onde as doses mais elevadas de Evaporitos 1 e de Evaporitos 2 apresentaram valores significativamente maiores quando comparados ao controle negativo ($P < 0,05$).

Tabela 5: Valores médios (média \pm desvio padrão) obtidos a partir do ensaio Cometa

| Contagem em (100 células) | | |
|---------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| | Índice de dano | Frequência de dano |
| Controle negativo | 77,25 \pm 4,65 | 44,00 \pm 4,24 |
| Controle positivo | 224,30 \pm 84,30* | 74,33 \pm 28,01 |
| Evaporitos 1 | | |
| Doses (g/ml) | | |
| 0,003 | 125,00 \pm 23,24 | 59,25 \pm 6,45 |
| 0,006 | 150,00 \pm 50,77 | 61,25 \pm 16,48 |
| 0,013 | 206,00 \pm 62,40 | 71,25 \pm 15,44 |
| 0,025 | 322,30 \pm 17,90** | 90,25 \pm 4,57* |
| 0,050 | 290,50 \pm 34,08* | 89,75 \pm 10,34* |
| Evaporitos 2 | | |
| Doses (g/ml) | | |
| 0,003 | 101,00 \pm 24,52 | 45,67 \pm 14,01 |
| 0,006 | 120,30 \pm 22,23 | 52,00 \pm 8,00 |
| 0,013 | 187,80 \pm 60,10 | 68,00 \pm 14,94 |
| 0,025 | 205,50 \pm 45,12 | 76,75 \pm 9,91 |
| 0,050 | 313,5 \pm 25,98**, ^a | 90,75 \pm 4,19* |

* Diferença significativa em relação ao grupo controle negativo com $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

^a Diferença significativa em relação a menor dose do mesmo grupo $P < 0,05$. Teste de

Kruskal-Wallis.

A tabela 6 apresenta os resultados do teste de MN. Parâmetros como a frequência de MNs, de ponte nucleoplasmática e de broto nuclear foram analisados. De acordo com a tabela é possível verificar que as amostras de Evaporitos não apresentaram efeito mutagênico quando comparadas ao controle negativo.

Tabela 6: Valores médios (média \pm desvio padrão) obtidos a partir do teste de Micronúcleo

| Teste de Micronúcleo (1000 linfócitos binucleados) | | | |
|--|-------------------|------------------------|-----------------|
| | Micronúcleo | Ponte nucleoplasmática | Broto nuclear |
| Controle negativo | 5,50 \pm 3,79 | 2,25 \pm 2,50 | 1,25 \pm 0,96 |
| Controle positivo | 16,75 \pm 7,50 | 11,00 \pm 4,69 | 1,75 \pm 0,96 |
| Evaporitos 1 | | | |
| Doses (g/ml) | | | |
| 0,003 | 5,25 \pm 2,75 | 1,50 \pm 1,00* | 1,00 \pm 0,82 |
| 0,006 | 3,50 \pm 1,29* | 1,25 \pm 0,50* | 1,25 \pm 0,96 |
| 0,013 | 4,50 \pm 3,00 | 1,25 \pm 0,96* | 1,50 \pm 1,29 |
| 0,025 | 3,50 \pm 2,52* | 1,50 \pm 1,29 | 2,00 \pm 0,82 |
| 0,050 | 3,25 \pm 1,26 | 1,25 \pm 0,50 | 2,25 \pm 1,26 |
| Evaporitos 2 | | | |
| Doses (g/ml) | | | |
| 0,003 | 9,75 \pm 8,99 | 2,75 \pm 1,50 | 0,75 \pm 0,96 |
| 0,006 | 6,00 \pm 2,58 | 1,75 \pm 0,5 | 1,25 \pm 0,50 |
| 0,013 | 4,00 \pm 2,16 | 2,00 \pm 0,82 | 0,75 \pm 0,50 |
| 0,025 | 4,25 \pm 2,06 | 1,75 \pm 0,96 | 1,25 \pm 1,50 |
| 0,050 | 2,00 \pm 0,82** | 1,25 \pm 1,26* | 1,50 \pm 1,29 |

* Diferença significativa em relação ao grupo controle positivo com $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Teste de Kruskal-Wallis

5. DISCUSSÃO

O carvão mineral apresenta uma alta gama de fontes poluidoras, como as usinas de queima de carvão. Nestas usinas, o processo de combustão desse mineral, libera gases e partículas que são capazes de penetrar na atmosfera em quantidades

significativas apresentando um grande potencial poluidor à saúde e ao meio ambiente (Celik, 2007). Porém, é no processo de beneficiamento do carvão mineral que é gerado um grande volume de efluente, sendo este um dos maiores agentes poluidores da atividade carbonífera. A composição química deste efluente é basicamente formada por soluções de silicatos, argilas, sulfatos, hidróxidos, óxidos, carbonatos e sólidos amorfos, podendo atingir valores extremos com pH que gira em torno de 2. Essas soluções se formam quando uma substância se dispersa de maneira uniforme em outra. O mecanismo de formação de soluções depende das intensidades relativas de forças atrativas: forças anteriores ao processo de dissolução, ou seja, forças atrativas entre as partículas do soluto e forças atrativas entre as partículas do solvente, bem como das forças que surgem entre as partículas do soluto e do solvente, durante o processo de dissolução. Dessa maneira, fatores tais como tamanho e carga dos íons, tamanho e polaridade das moléculas, forças dipolares e forças dispersivas, ligação de hidrogênio e temperatura devem ser considerados na análise e entendimento dos processos de dissolução e solubilidade destas soluções formadas, literatura especializada química inorgânica informa que a solubilidade para todos os sais dos metais alcalinos decresce à medida que se desce no grupo, exceto para os fluoretos e carbonatos (Silva, 2004).

O processo de beneficiamento pode ser realizado de diversas maneiras: por processos de beneficiamento de ultrafinos; por finos de carvão; por beneficiamento de grossos de carvão; por beneficiamento grosseiros de carvão e, em todos esses processos temos a geração de uma grande quantidade de resíduos que, com o tempo e com contato com a água, geram as drenagens ácidas (Kelly & Spottiswood, 1982).

Em geral, as DMCs têm origem basicamente em algumas reações químicas que possuem como principal fonte de ativação a oxidação da pirita em meio aquoso além de elevada carga orgânica deriva da composição natural do carvão contendo elevadas concentrações de HPAs e outros compostos orgânicos carcinogênicos. Este processo pode muitas vezes gerar uma grande quantidade de ácido sulfúrico, tornando as drenagens ácidas altamente tóxicas.

Além disso, estudos mostram que as drenagens ácidas geram misturas complexas que apresentam mais de 90 constituintes (elementos) diferentes (Silva et al., 2011; Saikia et al., 2014; Ribeiro et al., 2010; Oliveira et al., 2012b), dentre estes

elementos estão óxidos, sílica, hidrocarbonetos e diversos metais, que podem apresentar potencial genotóxico e/ou mutagênico, levando alterações profundas nas populações e ecossistemas (Wiley & Sons, 1990).

Um dos rejeitos carboníferos são os sulfetos de Fe provenientes de solos contaminados pela drenagem ácida do carvão, que induz um aumento na deposição de metais em espécies vegetais, e estas mediante o consumo, levam a um potencial para genotoxicidade (Villatoro-Pulido et al., 2009). Isso se explica em virtude de algumas espécies vegetais serem tolerantes a metais e apresentarem a propriedade de bioacumulação (Clemens, 2006). Assim, através da cadeia alimentar os níveis tróficos mais elevados geralmente bioacumulam as maiores concentrações de metais até atingir níveis nocivos, tais como a capacidade de induzir danos ao material genético (Wiley & Sons, 1990).

Trabalhos realizados na identificação dos minerais mais abundantes nos resíduos de mineração de carvão da região sul catarinense descrevem, em ordem de importância decrescente, a caulinita, o quartzo, a pirita e a calcita como os minerais mais abundantes, comprovando os resultados obtidos na técnica de DRX são os resultados das transformações mineralógicas entre estes minerais solubilizados em meios hiperácidos (Silva et al., 2011).

As amostras Evaporitos 1 e 2 são constituídas de cristais formados a partir da evaporação da água em contato com as rochas, que depois esfria, condensa e cristalizam os minerais. Ambas as amostras tiveram predominância de melanterita e halotriquitita, com menores fases de gipsita, hematita e halita. Tais minerais têm sua presença facilmente justificada por ocorrerem em evaporitos, pois a precipitação química dos sais dissolvidos no meio aquoso gera depósitos de sulfatos e cloretos (Silva et al., 2011).

A hematita encontrada nas amostras, apesar de insolúvel em pH neutro, se origina do intemperismo do solo da região que apresenta sulfeto de ferro gerado pela vegetação local em ambiente redutor e por rejeitos de carvão explorado. Em presença de pH extremamente ácido, com grandes concentrações de ferro trivalente e sulfatos, há a lixiviação e a concentração de hidróxido de ferro que, ao reduzir o volume d'água nos rios, gera a formação de óxidos de ferro como a hematita. Ressalta-se que

a hematita só é solúvel em água com pH menor que 3, como é o caso das DMC do rio Rocinha.

Estudos comprovam que a melanterita ocorre em áreas expostas à umidade do ar, formando-se em ambientes próximos da superfície a partir da oxidação de minerais de sulfeto como a pirita e a marcasita, além de outros sulfetos de ferro. A halotriquita é um sulfato altamente hidratado de alumínio e ferro, solúvel em água, formada pelo intemperismo e decomposição da pirita, argilas e outros minerais que contenham Fe e Al. As grandes concentrações de ambos minerais nas amostras analisadas podem determinar que as antigas atividades mineradoras juntamente com o abandono das minas de carvão impactaram diretamente aquela região, gerando minerais altamente solúveis em água, o que facilita a biodisponibilidade de tais elementos ao ambiente local (Villatoro-Pulido et al., 2009). Portanto, a ação do tempo e a solubilização de minerais em pH ácido acabam depositando estes conjuntos complexos de minerais na forma de cristais formados nas superfícies de rochas na área carbonífera catarinense. Essa formação mineralógica ocorre quando a água é evaporada para a atmosfera, depositando os minerais presentes nela, formando assim os evaporitos encontrados nas tabelas 2 e 3. Estudos indicam que os evaporitos são gerados sempre onde ocorrem baixo fluxo de água e que a mesma apresente minerais dissolvidos nela (Clemens, 2006; Beyersmann & Hartwig, 2008), porém a genotoxicidade e citotoxicidade deste material gerado através das DMC somente foi analisada neste estudo, sendo então inovador e de grande importância para as minerações de carvão a nível global.

O ensaio cometa (EC) é um biomarcador utilizado no biomonitoramento humano, ocupacional e ambiental, e detecta os danos ao DNA induzidos por agentes genotóxicos. Esses agentes são distribuídos no ecossistema (água, solo, ar), incluindo regiões que sofrem com o processo de beneficiamento do carvão. Neste estudo, os resultados encontrados no EC foram que as duas doses mais concentradas de Evaporitos 1 e a dose mais concentrada de Evaporitos 2 apresentaram dano genotóxico ao DNA. Tal resultado está de acordo com alguns trabalhos previamente reportados, que indicam que a presença de metais pesados em amostras ambientais podem apresentar potencial genotóxico em ensaios biológicos (Beyersmann e Hartwig, 2008).

Na análise realizada com o intuito de identificar aparte inorgânica solúvel das amostras de evaporitos 1 e 2 pela técnica PIXE, foi identificada a presença de Zn e Cr nas duas amostras de evaporitos e o conteúdo elevado de Fe e Cr na amostra de evaporitos 1. Esses metais são característicos de resíduos de drenagens ácidas (Saikia et al., 2014; Levandowski, 2009; Krebs, 2004), pois de acordo com os principais metais encontrados em estudos realizados com resíduos de beneficiamento de carvão estão presentes o Fe, Mn, Zn, Cu, Zn, Ni, entre outros (Villatoro-Pulido et al., 2009).

Estudos envolvendo metais pesados demonstram que os mesmos são considerados tóxicos conhecidos por induzir a dano em múltiplos órgãos, mesmo em níveis mais baixos de exposição. Eles são classificados como cancerígenos para os humanos (conhecido ou provável) de acordo com a Proteção Ambiental dos EUA e da Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (Chang, 1996)

Geralmente a genotoxicidade por elementos potencialmente tóxicos (EPTs) depende do modo de ocorrência dos mesmos, e, é causada por mecanismos indiretos como a inibição do sistema maior de reparo de DNA, resultando em instabilidade genômica e acúmulo de mutações críticas, desregulação da proliferação celular por indução de vias de sinalização ou inativação do controle do crescimento tais como os genes de supressão tumoral (Beyermann & Hartwig, 2008).

Os íons metálicos podem agir danificando diretamente o DNA ou levar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) os quais interagem com uma variedade de moléculas, incluindo, ácidos graxos saturados, proteínas e o DNA, levando subsequente morte e/ou apoptose (Lima et al., 2007).

Nas duas amostras de Evaporitos foram encontrados EPTs, tanto na amostra sólida via DRX, como na fração lixiviável estudada por PIXE. Estudos envolvendo dano oxidativo, toxicidade e carcinogênese induzida pelo metal avaliaram elementos como Ni, Cu, Co, Cr, como sendo altas fontes de toxicidade genética devido a geração de estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode resultar na ativação de vias de sinalização celular, aumento da expressão de fatores de transcrição específicos e citocinas inflamatórias, apoptose, efeitos genotóxicos e transformação celular (Botchway, 1997)

Entre os elementos químicos presentes no carvão, associados a genotoxicidade, os metais pesados estão em altas concentrações. Os metais que destacam-se são o Fe, Zn, Ni e Pb, etc. O Zn apresenta potencial para formar complexos com os óxidos de ferro e manganês (minerais) ou com a matéria orgânica, ou no caso dos sedimentos anaeróbios, com os sulfetos, para os solos, o zinco é fortemente absorvido às fases minerais (óxidos, sílica, carbonato, partículas de argila) (ABCM 2012).

Estudos com metais pesados como o Zn revelaram que esses metais quando liberados para o meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento tornam-se letais devido à sua capacidade de formarem compostos estáveis que permanecem no meio ambiente durante vários anos (Marcantonio, 2005). O Zn quando se encontra em contato com o solo é responsável por efeitos ecológicos em invertebrados. Quando lançados para o meio aquático estes dispersam-se com maior facilidade, afetando várias cadeias alimentares, provocando reduções nas taxas de crescimento e reprodução, podendo levar a eliminação completa da biota na zona afetada. Um outro grande problema da contaminação do meio ambiente por metais pesados é a sua capacidade de bioampliação e de bioacumulação, provocando, assim, efeitos ainda mais danosos no ambiente (Marcantonio, 2005).

A amostra Evaporito 1 apresentou um potencial genotóxico maior, pois as duas maiores doses causaram dano ao DNA. A amostra de evaporitos 1 foi coletada em um local mais próximo a drenagem ácida em relação a amostra de evaporitos 2. Na amostra de Evaporito 1, foi detectada uma maior concentração de Fe e Cr na fração solúvel estudada por PIXE.

Estudos comprovam que a presença de Fe podem induzir a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo, devido a suas propriedades físico-químicas ele desloca o balanço redox celular para um estado pro-oxidante, levando a uma diversidade de sintomas, morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Juntamente com o Fe, o Cr também apresenta toxicidade o que irá depender da forma como ele é encontrado, as formas de oxidação encontradas são: cromo (0), cromo (III) e cromo (VI) (Jones, 1984).

Na análise do teste de micronúcleo que foi realizado afim de estimar o potencial mutagênico, avaliando-se a frequência de MNs, de pontes nucleoplasmáticas e de broto nucleares, não foi encontrada diferença estatisticamente

significativa nas amostras de evaporitos quando comparada ao grupo controle. Assim, potencial mutagênico não é característico destas amostras de evaporitos, apesar de serem mais solúveis em água e conterem alguns elementos considerados altamente tóxicos como o Al, Cu e o Cr.

Desta forma, estes elementos e os metais pesados presentes quando dispostos em lugares ácidos formam diversos elementos secundários como a maioria dos sulfetos e hidróxidos, tornando assim estas amostras de Evaporitos, genotóxicas, ou seja, substâncias que são capazes de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos.

Estudos envolvendo efluentes de drenagens ácidas demonstraram que a exposição do solo e recursos hídricos a esse material contaminado levaram ao risco de contaminação dos vegetais plantados no solo, podendo levar a danos causados ao DNA e risco à saúde humana caso esses vegetais sejam consumidos (Beyersmann, 2008). Outros trabalhos também apresentaram que partes aéreas de vegetais comestíveis irrigados por essas águas contaminadas com metais apresentaram ser potencialmente genotóxicos a saúde humana (Villatoro-Pulido *et al.* 2009).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi observado aumento de danos ao DNA pelo ensaio Cometa induzido pelas amostras de Evaporitos 1 e 2 em células V79. Esse aumento de dano foi relacionado com o conteúdo destas amostras que são formadas por minerais cristalizados (evaporitos) sobre rochas presentes em DMC que apresentaram potencial genotóxico. Este trabalho também fornece evidências da presença de compostos inorgânicos nestas amostras coletadas em DMC que impactam o rio Rocinha (SC), apresentando a amostra de Evaporitos 1 um conteúdo mais elevado de EPTs se comparado a amostra Evaporito 2.

Este trabalho foi o primeiro a investigar o potencial genotóxico deste tipo de amostra ambiental, mostrando a importância de serem realizados outros ensaios para avaliar a toxicidade de amostras provenientes de beneficiamento do carvão mineral, afim de demonstrar a real toxicidade dos múltiplos compostos formados nesse complexo ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABCM, Associação Brasileira de Carvão Mineral. Disponível em: http://www.carvaomineral.com.br/interna_conteudo.php?i_subarea=8&i_area=4 Acesso dia 10 de agosto de 2012.
- ALBERTSON, D.G. Gene amplification in câncer. *Trends Genetics*. v. 22. n. 8. p. 447-455. 2006.
- BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SERALINI, G. E. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 53. n. 1. p. 126-133. 2007.
- BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 82: 493–512. 2008.
- BOEIRA, R. C.; RAIJ, B.van; SILVA, A.S. & MAXIMILIANO, V.C.B. Extração simultânea de alumínio, cálcio, magnésio, potássio e sódio do solo com solução de cloreto de amônio. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:29-936, 2001.
- BOLOGNESI, C.; CREUS, A.; WEGMAN, O. P.; MARCOS, R. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*. v. 26. p. 19-26. 2011.
- BOSTICK, B.C.et al. Influence of cadmium sorption on FeS₂ oxidation. *Environmental Science & Technology*, v.34, p.1494-1499, 2000.
- BOTCHWAY, S.W.; STEVENS, D.L.; HILL, M.A.; JENNER, T.J. and O'Neill P. Induction and rejoining of DNA doublestrand breaks in Chinese hamster V79-4 cells irradiated with characteristic aluminum K and copper L ultrasoft X rays. *Radiat Res*, 148: 317-324. 1997.
- BOGGS, JANE G. Simple Partial Seizures. Disponível em: . Acesso em: 26 jul. 2010.
- BORM, P. J. A., 1997, Toxicity and occupational health hazards of coal fly ash (CFA). A review of data and comparison to coal mine dust. *Ann. Occup. Hyg.*, 41(6): 659-676.

- BULLOCK, R.L. General Mine Planning. In: Underground Mining Handbokk. Letleton: W.AHustrulid, 1982.
- CALDON, C. E.; DALY, R. J.; SUTHERLAND, R. L.; MUSGROVE, E. A. Cell cycle control in breast cancer cell. *Journal of Cellular Biochemistry*. v. 97, p. 261-274, 2006.
- CARTER, P.; PRESTA, L.; GORMAN, C .M.; RIDGWAY, J. B.; Henner, D.; WONG, W. L.; ROWLAND, A. M.; KOTTS, C.; CARVER, M. E.; SHEPARD, H. M. Humanization of an anti-HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science*. v. 89. n. 10. p. 4285-4289. 1992.
- CARTER, S. B. Effects of cytochalasin on mammalian cells. *Nature*. v. 213, p. 261-264, 1967.
- CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica**. 3 ed. Artmed, 2001. CELIK M.; DONBAKA L.; UNAL F.Y.; UZBASIOGLU D.; AKSOY H.; YILMAZ S. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutation Research*. 627:158–163. 2007.
- CHANG, L.W.; MAGOS, L.; SUZUKI, T., editors. *Toxicology of Metals*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1996.
- CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimica*, v.88, p. 1707-1719. 2006.
- CUTRUNEO, C.M.N.L.; Oliveira, M.L.S.; Ward, C.R.; Hower, J.C.; de Brum, I.A.S.; Sampaio, C.H.; Kautzmann, R.M.; Taffarel, S.R.; Teixeira, E.C.; Silva, L.F.O. A mineralogical and geochemical study of three Brazilian coal cleaning rejects: Demonstration of electron beam applications. *International Journal of Coal Geology*, v.130, p. 33-52, 2014.
- DEVASAHAYAM S. Chemistry of acid production in black coal mine washer wastes. *Int J Min Proc*. v. 79, p. 1–8, 2006.
- DIAS, C.L.; Oliveira, M.L.S.; Hower, J.C.; Taffarel, S.R.; Kautzmann, R.M.; Silva, L.F.O. Nanominerals and ultrafine particles from coal fires from Santa Catarina, South Brazil. *International Journal of Coal Geology*, v. 122, p. 50-60, 2014.

- DING, M.; CHEN, F.; SHI, X.; YUCESAY, B.; MOSSMAN, B. and VALLYATAHN, V. Diseases caused by silica: Mechanisms of injury and disease development. *Int. Immunopharmacol.* 2, 173–182. 2002.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, n. 455. p. 81-95, 2000
- FENECH M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics – diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 46: 1365-1370.
- FENECH, M.; KIRSCH V. M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridges and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. v. 26, p. 125-132, 2011.
- FINKELMAN RB. Modes of occurrence of potentially hazardous elements in coal: Levels of confidence. *Fuel Proc Tech.* v.39, p. 21-34, 1994.
- GÖTHE, C.A.V. Diagnóstico Ambiental da Região Carbonífera Catarinense. In: *Enc. Nac. Est. Meio Ambient*, 2, 1989. Florianópolis Anais. Florianópolis: Depto Geociências. UFSC, v 3, p.62-103, 1989
- GRAU, MARIA DOLORES MORENO. *Toxicología Ambiental: Evaluación de riesgo para salud humana*. Ed McGraw-Hill/Teramericana de España, S. A. U. v.1., p 199 – 220. 2003.
- GRETHEL, LEON; PÉREZ, LYDA ESPITIA; LINARES, JUAN CARLOS; HARTMANN, ANDREAS; QUINTANA, Milton. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Science Direct. Mutation Research* 630 (2007) ISOBE, Y.; YAMADA, K.; WAN, Q.; SAKAMOTO, K.; UCHIYAMA, I.; MIZOGUCHI, T.; ZHOU, Y. Measurements of indoor sulfur dioxide emission from coal biomass briquettes. *Water, Air, Soil Pollut.* v. 163. p. 341-353, 2005.
- HOWER, J.C. ; O’Keefe, J.M.K.; Henke, K.R.; Wagner, N.J.; Copley, G.; Blake, D. R.; Garrison, T.; Oliveira, M.L.S.; Kautzmann, R.M.; Silva, L.F.O. Gaseous emissions and sublimates from the Truman Shepherd coal fire, Floyd County,

- Kentucky: A re-investigation following attempted mitigation of the fire. *International Journal of Coal Geology*, v. 116, p. 63-74, 2013.
- IBAMA. Fauna: legislação. Brasília, 2006. [www.ibama.gov.br]. Acessado em 20/06/2015.
- JONES, M.J., Gill, P. *The Institution of Mining and Metallurgy*, 1984.
- KELLY, E.G.; SPOTTISWOOD, D.J. *Introduction to mineral processing*. New York: John Wiley & Sons, 1982.
- KREBS, A. S. J. Contribuição ao conhecimento dos recursos hídricos subterrâneos da porção correspondente à bacia do rio Araranguá, SC. 2004. 376 p. Tese (Doutorado em Geografia) – Departamento de Geociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis
- LEVANDOWSKI, J.H., *Petrologia e geoquímica das camadas de carvão e sua relação com gás natural determinado no poço CBM 001-ST-RS, Bacia do Paraná*. 2009. Porto Alegre: UFRGS, 81f. 2009.
- LEFFA, DANIELA DIMER; DAMIANI, ADRIANI PAGANINI; SILVA, JULIANA DA; ZOCHHE, JAIRO JOSÉ; SANTOS, CARLA ELIETE IOCHIMS DOS; BOUFLEUR, LIANA APPEL; DIAS, JOHNNY FERRAZ; ANDRADE, VANESSA MORAES de. Evaluation of the Genotoxic Potential of the Mineral Coal Tailings Through the *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Springer. Arch Environ Contam Toxicol* 59 (2010) LIMA, P.D.; LEITE, Leite D.S.; VASCONCELLOS, M.C.; CAVALCANTI, B.C.; SANTOS, R.A.; COSTA-LOTUFO, L.V. et al. Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Food Chem Toxicol*, 45: 1154-1159. 2007.
- MARCANTONIO, A., 2005 – Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: Toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos. Universidade Estadual Paulista
- MARTINELLO, K.; Oliveira, M.L.S.; Molossi, F.A.; Ramos, C.G.; Teixeira, E.C.; Kautzmann, R.M.; Silva, L.F.O. Direct identification of hazardous elements in ultra-fine and nanominerals from coal fly ash produced during diesel co-firing. *Science of the Total Environment*, v. 470-471, p. 444-452, 2014.

- MENDONÇA FILHO, J.G. 2010. Geoquímica do Petróleo. In: Flores, D., Marques, M., (Eds.), XVI Semana de Geoquímica/X Congresso de Geoquímica dos Países de Língua Portuguesa, Porto, Memórias 16, pp. 3-56.
- MENEZES, ANA PAULA SIMÕES; SILVA, JULIANA DA; ROLOFF, JOICE; REYES, JULIANA; DESBASTIANI, RAFAELA; DIAS, JOHNNY F.; ROHR, PAULA; FALCÃO, FERRAZ. Baccharis trimera (Less.) DC as Genotoxicity Indicator of Exposure to Coal and Emissions from a Thermal Power Plant. Springer. Arch Environ Contam Toxicol 65 (2013).
- MUNARI, CC, ALVES, JM, BASTOS, JK, TAVARES, DC. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of Baccharis dracunculifolia extract on V79 cells by the comet assay. Journal Applied Toxicology, v. 30, p. 22-28, 2010.
- OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R. .K.; JOHANNES, C., GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ-LOPEZ, W., FOLLE, G .A.; DRETS, M. E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. Mutation Reserch. v. 504, p. 17-36, 2002.
- OLIVEIRA, M. L.S. ; Ward, C.R.; French, D.; Hower, J.C.; Querol, X.; Silva, L.F.O. . Mineralogy and leaching characteristics of beneficiated coal products from Santa Catarina, Brazil. International Journal of Coal Geology, v. 94, p. 314-325, 2012a.
- OLIVEIRA, M. L.S. ; Ward, C.R.; Izquierdo, M.; Sampaio, C.H.; de Brum, I.A.S.; Kautzmann, R.M.; Sabedot, S.; Querol, X.; Silva, L.F.O. Chemical composition and minerals in pyrite ash of an abandoned sulphuric acid production plant. Science of the Total Environment, v. 430, p. 34-47, 2012b.
- OLIVEIRA, M.L.S.; Ward, C.R.; Sampaio, C.H.; Querol, X.; Cutruneo, C.M.N.L.; Taffarel, Silvio R. ; Silva, L.F.O. Partitioning of Mineralogical and Inorganic Geochemical Components of Coals from Santa Catarina, Brazil, by Industrial Beneficiation Processes. International Journal of Coal Geology, v. 116, p. 75-92, 2013.
- QUISPE, D.; Pérez-López, R.; Silva, L.F.O.; Nieto, J.M. Changes in mobility of hazardous elements during coal combustion in Santa Catarina power plant (Brazil). Fuel, v. 94, p. 495-503, 2012.

- RIBEIRO, J.; DaBoit, K.; Flores, D.; Ward, C.R.; Silva, L.F.O. Identification of nanominerals and nanoparticles in burning coal waste piles from Portugal. *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 6032-6041, 2010.
- RIBEIRO, J.; Taffarel, S. R.; Sampaio, C. H.; Flores, D.; Silva, L.F.O. Mineral speciation and fate of some hazardous contaminants in coal waste pile from anthracite mining in Portugal. *International Journal of Coal Geology*, v. 109-110, p. 15-23, 2013.
- RITCHIE, BRANSON W.; HARRISON, GREG J.; HARRISON, LINDA R. Avian Medicine: principles and applications. WINGERS PUBLISHING, INC.: Florida, 1994.
- SILVA, L. A.; MARTINS, C. R.; DE ANDRADE, J. B.; *Quim. Nova* 2004, 27, 1016.
- SILVA, J. DA; FREITAS, T. R. O. DE; HEUSER, V.; MARINHO, J. R.; BITTENCOURT, F.; CERSKI, C. T. S.; KLIEMANN, L. M.; ERDTMANN, B. 2000b. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutation Research*. 470: 39-51. SINGH, N. P.; MACCOY, 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.
- RUSSELL, JOHN B.; *Química Geral vol.1*, São Paulo: Pearson Education do Brasil, Makron Books, 1994.
- SAIKIA, B.K.; Ward, C. R.; Oliveira, M.L.S.; Hower, J.C.; Braga, M.; Silva, L.F. Geochemistry and nano-mineralogy of two medium-sulfur Northeast Indian coals. *International Journal of Coal Geology*, v. 122, p. 1, 2014.
- SAIKIA, B.K. ; Ward, C.R. ; Oliveira, M.L.S. ; Hower, J.C. ; De Leão, F.; Johnston, M.N.; O'Bryan, A.; Sharma, A.; Baruah, B.P.; Silva, L.F.O. Geochemistry and nano-mineralogy of feed coals, mine overburden, and coal-derived fly ashes from Assam (North-east India): a multi-faceted analytical approach. *International Journal of Coal Geology*, v. 137, p. 19-37, 2015.
- SANCHÍS, J.; Oliveira, L.F.S.; De Leão, F. B.; Farrè, M.; Barcelò, D. Liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-Orbitrap analysis of

- fullerene aggregates on surface soils and river sediments from Santa Catarina (Brazil). *Science of the Total Environment*, v. 505, p. 172-179, 2015.
- SCHUBERT, H. *Aufbereitung fester mineralischer Rohstoffe*. VEB Deutscher für Grundstoffindustrie. Leipzig: v.1, 1989.
- SILVA, L.F.O. ; Moreno, T. ; Querol, X. . An introductory TEM study of Fe-nanominerals within coal fly ash. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 4972-4974, 2009.
- SILVA, Luis F. O. ; Macias, Felipe ; Oliveira, Marcos L. S. ; da Boit, M. Kátia ; Waanders, Frans . Coal cleaning residues and Fe-minerals implications. *Environmental Monitoring and Assessment (Print)*, v. 172, p. 367-378, 2011.
- SILVA L.F.O.; Querol, X.; da Boit, K.M.; Fdez-Ortiz de Vallejuelo S.; MADARIAGA, J.M. Brazilian Coal Mining Residues and Sulphide Oxidation by Fenton's Reaction: an accelerated weathering procedure to evaluate possible environmental impact. *Journal of Hazardous Materials (Print)*, v. 186, p. 516-525, 2011.
- SILVA, L.F.O.; Sampaio, C.H.; Guedes, A.; Fdez-Ortiz de Vallejuelo, S.; Madariaga, J.M. Multianalytical approaches to the characterisation of minerals associated with coals and the diagnosis of their potential risk by using combined instrumental microspectroscopic techniques and thermodynamic speciation. *Fuel*, v. 94, p. 52-63, 2012.
- SILVA, Luis F.O. ; FDEZ- ORTIZ DE VALLEJUELO, SILVIA ; MARTINEZ-ARKARAZO, IRANTZU ; CASTRO, KEPA ; Oliveira, Marcos L.S. ; Sampaio, Carlos H. ; de Brum, Irineu A.S. ; DE LEÃO, FELIPE B. ; TAFFAREL, Silvio R. ; MADARIAGA, JUAN M. . Study of environmental pollution and mineralogical characterization of sediment rivers from Brazilian coal mining acid drainage. *Science of the Total Environment*, v. 447, p. 169-178, 2013.
- SRÁM RJ, HOLÁ N, KOTESOVEC F, V'ÁVRA R. Chromosomal abnormalities in soft coal open-cast mining workers. *Mutation Research*. 144: 271-275, (1985).

- STICH, H. F., E M. P. ROSIN. “Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccalmucosa cells.” *International Journal of Cancer*, 1983: 305-308.
- THOMAS, P., K. UMEGAKI, E M. FENECH. “Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay.” *Mutagenesis*, 2003.: 187-194.
- THOMAS, P., N. HOLLAND, C. BOLOGNESE, V. M. KIRSCH, E S. BONASSI. “Buccal micronucleus cytome assay.” *Nature Protocols*, 2009: 825-837.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. v. 35. p. 206-221, 2000.
- VILLATORO P. M.; FONT, R.; DE HARO-BRAVO, M.I.; ROMERO, J.M.; ANTER, J.; DE HARO BAILÓN, A.; ALONSO, M. A.; MERCEDES DEL RIO-CELESTINO, M. Modulation of genotoxicity and cytotoxicity by radish grown in metal-contaminated Soils. *Mutagenesis* 24, 51–57. 2009.
- VILLELA, I. V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H. C.; SILVEIRA, J. D. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003. v 1 , cap. 7, p. 147-160.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Toxicological profile for uranium. Fevereiro de 2013.
- WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research*, v. 567, p. 227-345, 2004.
- WILEY, J. & SONS. **Heavy metals in solis, New York, USA. p. 339.**
- <http://www.iaea.org/statistics/>, acessado em 20/03/14
- <http://www.registro.unesp.br/sites/museu/basededados/arquivos/00000429.pdf> ,
acessado em 20/03/14
- <https://www.uky.edu/KGS/coal/beneficiation.htm> , acessado em 24/03/14

<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/saibamais/ensaios-genotoxicidade.pdf>, acessado em 27/03/14

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/86072/191935.pdf?sequence=1>, acessado em 10/04/14