
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GIOVANNA SEGATI CANIZELA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE SOLO DE UM CEMITÉRIO PAULISTA CUJAS COVAS E URNAS ESTÃO INSTALADAS EM UM TERRENO COM LENÇOL FREÁTICO PRÓXIMO À SUPERFÍCIE: UM ESTUDO DE CASO.

GIOVANNA SEGATI CANIZELA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE SOLO DE UM CEMITÉRIO
PAULISTA CUJAS COVAS E URNAS ESTÃO INSTALADAS EM UM
TERRENO COM LENÇOL FREÁTICO PRÓXIMO À SUPERFÍCIE:
UM ESTUDO DE CASO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Bacharela e
Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Maria Aparecida Marin-Morales

Coorientador: Letícia Rocha Gonçalves

Rio Claro - SP
2022

C223a	Canizela, Giovanna Segati Avaliação ecotoxicológica de solo de um cemitério paulista cujas covas e urnas estão instaladas em um terreno com lençol freático próximo à superfície: : um estudo de caso. / Giovanna Segati Canizela. -- Rio Claro, 2022 52 p. : il., tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Maria Aparecida Marin-Morales Coorientadora: Letícia Rocha Gonçalves 1. Necrochorume. 2. Fitotoxicidade. 3. Citogenotoxicidade. 4. Mutagenicidade. 5. A.cepta. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

GIOVANNA SEGATI CANIZELA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE SOLO DE UM CEMITÉRIO
PAULISTA CUJAS COVAS E URNAS ESTÃO INSTALADAS EM UM
TERRENO COM LENÇOL FREÁTICO PRÓXIMO À SUPERFÍCIE:
UM ESTUDO DE CASO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", para obtenção do grau de Licenciada e
Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin–Morales (orientadora)

Dr. Renato Nallin Montagnolli

Dra. Raquel Vaz Hara Jardim

Aprovado em: 13 de Janeiro de 2022

Assinatura do discente

Assinatura a orientadora

Assinatura da coorientadora

Dedico esse trabalho à minha família, por serem meu alicerce, minha base, meu lugar seguro e minha fonte de coragem, por me fazerem rir nos dias difíceis e me encorajarem a continuar. Amo vocês, obrigada por tanto.

Em memória de Jair Canizela e José Carlos da Silva (eu sei que vocês estariam orgulhosos se estivessem aqui).

Agradecimentos

Uau! Escrever essa parte do TCC significa que a jornada da graduação realmente está chegando ao fim. Já sinto meus olhos encherem de lágrimas. Tenho muito a agradecer!

Em primeiro lugar agradeço muito a Deus, por saber que sem Ele eu realmente nada poderia fazer. Papai, obrigada por estar comigo durante esses cinco anos, por ser um Deus soberano e ainda assim ser acessível e sempre me receber de braços abertos em amor, obrigada por caminhar comigo, por ser minha paz e meu refúgio, meu maior encorajador, sem você nada disso teria sentido e eu não conseguiria chegar até aqui. Essa conquista é nossa.

Agradeço à minha família pela oportunidade de ter vivido tudo isso, pelo apoio financeiro e por sempre darem um jeitinho de mostrar que estavam perto, apesar da distância física. Deixo registrado meus agradecimentos principalmente à: Melissa, Jef e Laurinha, obrigada pelo encorajamento a permanecer, pelas orações, pelos direcionamentos, pelos conselhos, pelos “vai ficar tudo bem”, à Laurinha por ser a melhor irmã de todas; Rodrigo e Naty obrigada por fazerem questão que eu vivesse essa experiência, por me encorajarem a sair de casa e a encarar os desafios de peito aberto, obrigada pela presença, pelas risadas e pelo apoio na escolha do curso; Arlete, obrigada por sonhar esse sonho comigo e por sempre me receber com um abraço e um bolo de chocolate, obrigada pelas mensagens todos os dias me lembrando que eu nunca estive sozinha. Também agradeço à: Amélia, Eugênia, Rafa, Pérola, Paulo e Cristina, por todo o encorajamento e amor. Amo todos! Sei que sem vocês seria infinitamente mais difícil, obrigada por tanto!

Deixo aqui o meu muito obrigada a todos que estiveram comigo no Laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA), no qual tive minha primeira experiência científica e a honra de desenvolver esse trabalho. Profa Marin, Leticia Rocha, Adriana, Nádia, Laís, Jaque, Cleitinho, Dânia, Leticia Gigeck, Maraiah, Leticia Rosa, Mariana, Ana Zullo, Ana Paula, Gaby, Matheus, Rodrigo, Kemellyn, Gabriel e todos os outros mutagênicos.

Agradeço especialmente à Profa Dra Marin por me receber de braços abertos e por ser uma excelente orientadora, foi uma honra aprender com você e vou levar os ensinamentos pra toda a vida! À minha co-orientadora e mamis científica Letícia Rocha, não tenho palavras! Obrigada por toda a disposição, carinho, por acreditar nesse trabalho e me ajudar a fazer com que ele ganhasse forma, você é extraordinária! À Adriana Correa (Dri) por ser simplesmente a melhor técnica do mundo, por todo o apoio, os ensinamentos, os puxões de orelha e todas as risadas! Ao meu “triozinho da desgraça” (Kemi e Gabriel), obrigada pelo apoio, vocês tornaram meus dias de laboratório muito mais engraçados.

Agradeço à família que eu ganhei de presente aqui em Rio Claro: Ligya, Hilário, Vivi, que precioso foi compartilhar esses anos com vocês, obrigada por me acolherem com tanto amor, por me tratarem como filha, por cada conselho, cada oração, cada abraço, cada vez que vocês me socorreram, me consolaram e me mostraram o que é ter um relacionamento de aliança. Obrigada até por cada filme ruim, vocês ganharam um espaço gigante no meu coração e foram meu porto seguro por aqui.

À minha turma, CBI 17, especialmente: Alicia, Amandinha, Andreza, Beth, Bielzera, Cata, Dani, Graveto, Hayen, Iryna, Joca, Ju, Kemi, Livinha, Lucas, Luqueta, Maíra, Mari, Mario, Mirele, Murilow e Tali. Obrigada por tornarem tudo mais leve, por cada rolê, cada almoço passando vergonha no RU, cada rodinha de conversa pós prova, cada aula matada na cantina, vocês são incríveis, tenho muito orgulho de todos e sei que o mundo só tem a ganhar com essa leva de biólogos que está se graduando. Todo o sucesso do mundo pra nós! Já sinto saudade da nossa convivência diária.

Às minhas amigas mais próximas: Dani, Mari e Kemi, é até difícil encontrar palavras amigas, obrigada por cada segundo compartilhado, por serem meu grupinho desde o primeiro momento, por todos os segredos, choros, trabalhos, perrengues e risos que dividimos. Vocês estiveram comigo do começo ao fim, viram meus melhores e meus piores dias e estiveram presentes em todos. Eu amo olhar pra trás e ver o tanto que a gente cresceu juntas, tenho muito orgulho de cada uma e sei que sem vocês não teria a menor graça!

À Amanda e Livia (piscina), a amizade de vocês foi um presente que eu amei. Amandinha, obrigada pela parceira no pocket, pelas conversas, orações e por refletir o amor de Deus. Livia, obrigada pelas muitas e muitas risadas, por cada ida no açai pra afogar as mágoas, cada carona, por sempre me ouvir e por alegrar a minha vida com seu jeitinho.

Ao Bruno, pelo que começou com uma parceira dentro do Depto de Resíduos e foi crescendo até se tornar o que temos hoje, pelas muitas marmitas, conversas e risadas, pela paciência em ouvir tudo sobre TCC e cebolas, por estar presente sempre que eu precisei, por me encorajar e me lembrar várias e várias vezes que ia ficar tudo bem nesse finalzinho de jornada, amei o que vivemos até aqui.

` À minha irmãzinha Kemellyn, que está sendo citada pela sexta vez, mas não poderia ser diferente, obrigada por ser minha parceira mais próxima de jornada. Ao longo dos anos nós duas dividimos: matérias, PET, pocket, laboratório, roupas, carro (obrigada por tantas caronas no seu), casa (você sabe que sempre vai ser bem-vinda na minha), famílias (obrigada pelos muitos churrascos em que entrei de penetra) e mais recentemente até a empresa. Dividimos sonhos, choros, orações, conquistas, frustrações e muitas risadas, obrigada por tanto, amiga! Quero te ver brilhando muito por aí, estarei sempre aqui pra te apoiar (e fofocar).

Ao meu vizinho, sombra, e amigo Gabriel, obrigada por tudo que dividimos, por cada leite condensado emprestado e nunca devolvido, por cada conversa, cada desabafo, cada conselho, pelas muitas risadas, obrigada por me socorrer sempre que eu precisei e por continuar estando perto, mesmo agora que estamos longe. Obrigada por sempre me encorajar do seu jeitinho peculiar, sua amizade tornou tudo mais leve!

À todos que fizeram parte do sonho do Pocket comigo (em especial a: Amanda, Ana Melo, Thaís, Priscila, Gabi, Isa, Milena, Marie, Marta e Kemi) e principalmente à Mari Vieira, por assumir a liderança e continuar a falar sobre o amor de Pai na Unesp. Todas vocês são presentes de Deus pra mim, contem comigo sempre.

À Gi que chegou até aqui, por ter sido forte & corajosa e não desistido. Que jornada! Ao olhar para trás e percebo como fui privilegiada de ter tantas pessoas incríveis ao meu lado e, mais uma vez, só tenho a dizer: muito obrigada.

*“Só eu conheço os planos que tenho para
você: prosperidade e não desgraça e um
futuro cheio de esperança. Sou eu o Senhor
que está falando.”*

- Jeremias 9:11

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE SOLO DE UM CEMITÉRIO PAULISTA CUJAS COVAS E URNAS ESTÃO INSTALADAS EM UM TERRENO COM LENÇOL FREÁTICO PRÓXIMO À SUPERFÍCIE: UM ESTUDO DE CASO.

Aluna: Giovanna Segati Canizela

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Co-orientadora: Letícia Rocha Gonçalves

RESUMO:

Os cemitérios são fontes potenciais de contaminação ambiental. No Brasil, apesar de existir uma regulamentação específica para a instalação de necrópolis, é expressivo o número de cemitérios irregulares. Os contaminantes dos cemitérios podem ser advindos de várias fontes, mas a principal delas é o necrochorume, um líquido mais viscoso que a água, de coloração castanho-acinzentada, composto por água (60%), sais minerais (30%) e substâncias orgânicas (10%), principalmente a cadaverina e a putrescina. A liberação desse líquido compromete a qualidade e a estrutura biológica do solo, bem como coloca em risco a saúde da população exposta. A implantação inadequada de cemitérios traz consequências para a própria decomposição dos corpos. Cemitérios instalados em solos muito úmidos, ou com lençóis freáticos mais superficiais, podem apresentar problemas com a decomposição cadavérica, cujos corpos sepultados podem permanecer, indefinidamente, em estágio de saponificação. O cemitério São João Batista da cidade de Leme- SP apresenta essa situação, pois parte da sua área tem covas que permanecem permanentemente inundadas por águas do lençol freáticos. Levando em conta essa problemática, o estudo teve como objetivo avaliar o impacto da contaminação de solo por necrochorume e por corpos que estão em processo de saponificação permanente, devido à alta umidade do terreno onde estão sepultados. Para esta avaliação, foram coletadas amostras de solo de sepulturas de áreas secas e inundadas do referido cemitério. As amostragens dos solos foram feitas nas proximidades de 3 sepulturas que apresentam condições diferentes de terrenos, com consequentes problemas de decomposição: ponto 1 – sepultura onde o cadáver está imerso em água do lençol freático, o que mantém o corpo saponificado, há mais de 12 anos; ponto 2 – sepultura cujo corpo, mesmo não estando em contato com a água freática, também se mantém saponificado por cerca de 12 anos, devido à alta umidade do terreno; ponto 3 - sepultura cujo cadáver foi sepultado cerca de 10 dias antes da coleta (sepultamento recente) em terreno seco, portanto sem interferência da umidade do lençol freático. Os solos amostrados foram submetidos ao processo de extração dos contaminantes, por solubilização. Os solubilizados foram utilizados em testes de fitotoxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade com os bioindicadores *L. sativa* e *A. cepa*, considerados eficientes organismos testes para estudos de monitoramento ambiental e análise de risco ocupacional a que os trabalhadores do local estão expostos. Pelos resultados obtidos, pode observar que todas as amostras analisadas apresentaram algum tipo de toxicidade. Os bioensaios realizados com a amostra do ponto 1 comprovaram a presença de substâncias com potencial citotóxico e mutagênico, os do ponto 2 denotaram ação citotóxica e fitotóxica do solo avaliado e os do ponto 3 apresentaram também ação citotóxica. Tais resultados comprovaram o potencial contaminante de cemitérios e a necessidade de monitoramento desses empreendimentos.

Palavras chave: Necrochorume; fitotoxicidade; citogenotoxicidade; mutagenicidade; *L. sativa*; *A. cepa*.

ABSTRACT:

Cemeteries are potential sources of environmental contamination. In Brazil, although there is a specific regulation for the installations of necropolis, the number of irregular cemeteries is expressive. The contaminants in cemeteries can come from various sources, but the main one is necroslurry, a liquid more viscous than water, with a grayish-brown color, composed of water (60%), mineral salts (30%) and organic substances (10%), mainly cadaverine and putrescine. The release of this liquid compromises the quality and biological structure of the soil, as well as putting the health of the exposed population at risk. The inadequate establishment of cemeteries has consequences for the decomposition of bodies. Cemeteries installed in very humid soils, or with more superficial water tables, can present problems with cadaveric decomposition, whose buried bodies can remain, indefinitely, in the saponification stage. The São João Batista cemetery installed in the city of Leme-SP presents this situation, as part of its area has caves that remain permanently flooded by water from the water table. Taking this issue into account, this study aimed to evaluate the impact of soil contamination by necroslurry and by bodies that are in the process of permanent saponification, due to the high humidity of the ground where they are buried. For this evaluation, soil samples were collected from graves in dry and flooded areas of the aforementioned cemetery. Soil samples were taken in the vicinity of 3 graves that have different terrain conditions, with consequent decomposition problems: point 1 – burial where the corpse is immersed in water from the groundwater, which keeps the body saponified, for more than 12 years old; point 2 – grave whose body, even not being in contact with groundwater, also remains saponified for about 12 years, due to the high humidity of the ground; point 3 - grave whose corpse was buried about 10 days before collection (recent burial) in dry ground, therefore without interference from the water table humidity. The sampled soils were submitted to the contaminant extraction process, by solubilization. The solubilized ones were used in phytotoxicity, cytogenotoxicity and mutagenicity tests with the bioindicators *L. sativa* and *A. cepa*, considered efficient test organisms for studies of environmental monitoring and occupational risk analysis to which workers at the site are exposed. From the results obtained, it can be seen that all analyzed samples showed some type of toxicity. The bioassays carried out with the sample from point 1 confirmed the presence of substances with cytotoxic and mutagenic potential, those from point 2 denoted cytotoxic and phytotoxic action of the evaluated soil and those from point 3 also showed cytotoxic action. These results confirmed the contamination potential of cemeteries and the need to monitor these environments.

Keywords: Cemetery leachate; phytotoxicity; cytogenotoxicity; mutagenicity; *L. sativa*; *A. cepa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Contaminação de solo e Aquíferos por Necrochorume	13
Figura 2: Composição do Nechochorume (fonte: adaptado de Bortolassi, 2012)	15
Figura 3: Sepulturas em condições ambientais de inundação e umidade	19
Figura 4, 5 e 6: Pontos de coleta de solo; 4 – Ponto 1, sepultura permanentemente inundada; 4 – Ponto 5, sepultura em condições de umidade; 6 – Ponto 3, sepultura de aproximadamente 10 dias	26
Figura 7: Fluxograma do Bioensaio de fitotoxicidade com <i>L.sativa</i> (fonte: adaptado de Sobero e Ronco,2004)	28
Figura 8: Fluxograma dos bioensaios de fitotoxicidade e citogenotoxicidade com <i>A.cepa</i>	30
Figura 9: Aspecto do desenvolvimento das raízes de <i>L.sativa</i> , teste de alongamento.....	33
Figura 10: Prancha imagens das células de <i>A.cepa</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores que afetam a decomposição cadavérica (fonte: adaptado de IOAN <i>et al</i> , 2017)	17
--	----

Tabela 2: Taxa de germinação das sementes de <i>L.sativa</i> expostas aos solubilizados de solo coletado nos pontos 1, 2 e 3, aos controles negativo e positivo	31
---	----

Tabela 3: Elongamento de raízes de <i>L. sativa</i> após exposição aos solubilizados de solo coletado nos pontos 1, 2 e 3, aos controles negativo e positivo	32
--	----

Tabela 4: Taxa de germinação das sementes de <i>A.cepa</i> expostas aos solubilizados de solo coletado nos pontos 1, 2 e 3, aos controles negativo e positivos	31
--	----

Tabela 5: Resultados dos ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade morte celular, realizadas com o bioindicador <i>A. cepa</i> , expostos solubilizados dos pontos 1, 2 e 3, aos controles positivos e ao controle negativo	33
---	----

Tabela 6: Síntese dos resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenidade dos diferentes tratamentos em <i>A. cepa</i>	34
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Cemitérios como fonte de contaminação ambiental.....	11
1.2 Contexto histórico dos cemitérios.....	14
1.3 Necrochorume.....	14
1.4 Decomposição cadavérica	15
1.5 Legislação Ambiental e a situação atual dos cemitérios no Brasil.....	17
1.6 Avaliação de contaminação ambiental de solos	19
1.6.1 Uso de bioindicadores vegetais	20
1.6.2 <i>L.sativa</i>	21
1.6.3 <i>A. cepa</i>	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Amostra testada.....	26
3.1.2 Material biológico	27
3.2. Métodos.....	27
3.2.1 Obtenção dos extratos solubilizados	27
3.2.2 Teste de fitotoxicidade em <i>Lactuca sativa</i>	27
3.2.3 Teste de citogenotoxicidade em <i>Allium cepa</i>	28
3.2.4 Análises estatísticas dos resultados	30
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cemitérios como fontes de contaminação ambiental

Os cemitérios são fontes potenciais de contaminação ambiental, que impactam negativamente a qualidade do solo, das águas superficiais e subterrâneas e do ar. Embora esse tipo de contaminação possa causar sérios danos ao ambiente e à saúde humana, grande parte da população desconhece esses riscos, ficando continuamente exposta a eles (KEMERICH *et al.*, 2012).

Os ambientes de cemitérios são impactados por contaminantes derivados de diferentes fontes de contaminação. A contaminação nesses ambientes se dá inicialmente no solo, mas acaba sendo transferida para os outros compartimentos ambientais, como a água e, eventualmente, o ar. Dentre os contaminantes das necrópolis, destacam-se os derivados de adereços de urnas mortuárias, que liberam contaminantes como os óxidos metálicos de Ti (titânio), Cr (cromo), Cd (cádmio), Pb (chumbo), Fe (ferro), Mn (manganês), Hg (mercúrio) e Ni (níquel); os compostos usados na tanatopraxia, como os formaldeído e o metanol, utilizados na prática de embalsamação de corpos e os enrijecedores, usados para maquiagem e preparar os cadáveres para a cerimônia de despedida; outros produtos químicos, como os pigmentos advindos das vestimentas dos cadáveres e tecidos dos adereços das urnas; os resíduos hospitalares, como remédios e quimioterápicos; além da carga microbiana, como bactérias, vírus e protozoários, oriunda dos corpos sepultados. Porém, além de todos esses contaminantes citados, existe nos cemitérios uma outra fonte de contaminação ainda mais perigosa: o necrochorume (PACHECO, 2012), que é o líquido liberado, continuamente, pelos cadáveres, durante o processo de putrefação (COSTA SILVA; FILHO, 2008).

A instalação mal planejada de cemitérios e a ausência de manutenção dos mesmos são fatores que podem aumentar ainda mais os impactos de diversas matrizes ambientais (PACHECO, 2012, SILVA e MALLAGUTTI, 2008), como a atmosfera, as águas interiores, superficiais e subterrâneas, os estuários, o mar territorial, o solo, o subsolo, os elementos da biosfera, a fauna e a flora” (BRASIL, 1981).

Em cemitérios horizontais, o solo é a primeira matriz a receber o necrochorume (PACHECO, 2012). Dentre os agentes presentes no necrochorume, estão compostos orgânicos, que acabam sendo consumidos pela microbiota do solo. Esse aporte de nutrientes ao ambiente edáfico promove um aumento da atividade microbiana, que leva, consequentemente, a um aumento dos teores de nitrogênio, fósforo e sais minerais, bem como da condutividade elétrica

nesses ambientes (KEMERICH *et al.*, 2012). De acordo com Neckel *et al* (2017), foi também verificado em diversos cemitérios horizontais brasileiros uma alta presença de contaminantes metálicos, como Cu, Zn, Fe, Mn, Pb e Ni, contaminantes estes que podem colocar em risco a saúde da população do entorno desses ambientes.

A dinâmica da percolação do necrochorume e a fixação de agentes biológicos deste líquido no ambiente edáfico são definidos pela própria composição estrutural do solo. A infiltração do necrochorume é feita através da zona insaturada do solo, ou zona de aeração (composta por partículas sólidas e espaços vazios, que podem ser ocupados por água e ar). Durante o trânsito do necrochorume no solo, vai também ocorrendo a retenção de patógenos nas partículas do solo, como, por exemplo, de bactérias e vírus (DENT, FORBES e STUART, 2004; SILVA e MALAGUTTI, 2009; KEMERICH *et al.*, 2012). Os vírus, por apresentarem estruturas extremamente pequenas, podem ser adsorvidos nas partículas minerais, devido às suas cargas elétricas, se fixando, temporariamente nesse ambiente (PACHECO, 2012). No entanto, a eficácia da retenção de microrganismos ao solo está relacionada a diversos fatores, como a permeabilidade, aeração, umidade e nutrientes do solo. Por essa razão, esses fatores são extremamente importantes para serem considerados na avaliação da adequabilidade do terreno para a instalação desse tipo de empreendimento (FORBES e STUART, 2004; SILVA e MALAGUTTI, 2009; KEMERICH *et al.*, 2012).

Um outro fator a ser considerado nas atividades cemiteriais é a profundidade em que ocorre o sepultamento dos corpos. Como o teor de oxigênio no solo decresce com a profundidade, os locais onde os corpos são dispostos têm, então, uma baixa concentração de oxigênio disponível, gerando melhores condições para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbicos patogênicos, o que aumenta os riscos de propagação de doenças (KEMERICH *et al*, 2012; ŻYCHOWSKI e BRYNDAL, 2015).

Pelo fato do necrochorume ser solúvel em água e, conseqüentemente, percolar no solo, seus compostos podem ser carreados até as águas subterrâneas, ou seja, podem atingir os aquíferos. O alto coeficiente de permeabilidade dos solos e a presença de rachaduras nos túmulos, associados à negligência na administração dos cemitérios, são fatores que facilitam a contaminação de água subterrânea (SILVA e MALAGUTTI, 2009). O esquema abaixo ilustra o caminho percorrido por este líquido passando pelo solo e contaminando os recursos hídricos.

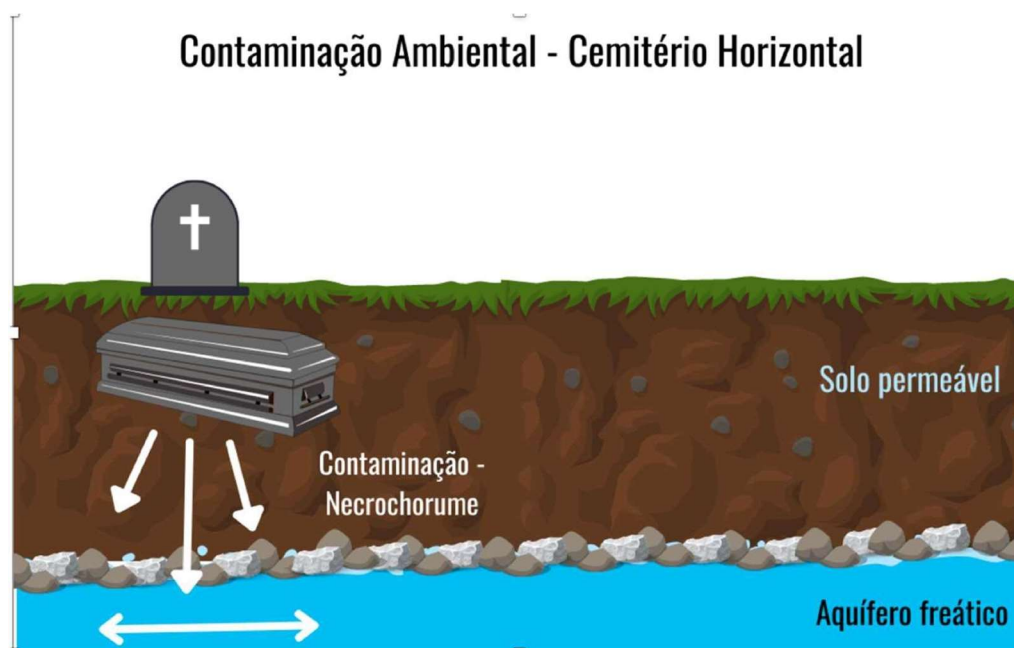


Figura 1: Contaminação de solo e de aquíferos por Necrochorume. Fonte: autoria própria

No Brasil, 61% da população é abastecida com águas subterrâneas, coletadas em aquíferos. No estado de São Paulo, por exemplo, 80% dos municípios são abastecidos dessa forma. Considerando esses dados, cabe o alerta de que muitas comunidades que fazem uso de água subterrâneas podem estar instaladas nas proximidades de cemitérios. Nesses casos, se os compostos advindos da putrefação cadavérica atingirem os lençóis freáticos e, conseqüentemente, as águas dos poços, essa contaminação poderá configurar um sério risco à saúde da população exposta (PACHECO, 2012). Tal preocupação aumenta ainda mais se considerarmos as descrições de Neckel *et al* (2017), de que cemitérios urbanos, de maneira geral, encontram-se localizados em áreas de baixo valor econômico, portanto em regiões de baixo desenvolvimento socioeconômico, nas quais as condições de saneamento básico não são adequadas, fato este que pode potencializar as conseqüências desse tipo de contaminação ambiental.

A contaminação por atividades cemiteriais ganha ainda mais relevância se levarmos em consideração o cenário pandêmico atual da COVID-19, onde mais de 580.000 vidas foram perdidas no Brasil (Ministério da Saúde, 2021) o que, certamente, levou a uma sobrecarga de contaminantes nos cemitérios, com possibilidades aumentadas de propagação do vírus Sars-CoV-2, principalmente pelos cemitérios indevidamente implantados ou gerenciados.

Apesar de não existir muitas informações disponíveis sobre do comportamento de disseminação do novo vírus depois da morte de seu hospedeiro, já se tem estudos que comprovam que vírus da família dos Corona vírus podem ser propagados, via necrochorume,

após morte do indivíduo. Assim, pela possibilidade também do necrochorume carrear vírus e bactérias, esse tipo de contaminante pode amplificar o raio de contaminação por patógenos, auxiliando então para uma maior propagação de doenças (CALMON, 2020, SOARES, RAMOS e MACHADO, 2020; NASCIMENTO, 2020, YAACOUB *et al*, 2020; GONÇALVES *et al*, 2021).

1.2. Contexto histórico dos cemitérios

A disposição final dos corpos humanos é uma problemática instituída em todas as sociedades ao longo da história. No passado, cerca de 100.000 a.C., era comum que os corpos fossem sepultados no solo, em interiores de grutas. Já os primeiros registros de cemitérios com sepulturas agregadas datam de cerca de 10.000 a.C. Na Idade Média, a Igreja passou a ter a responsabilidade pelos sepultamentos, que passaram a ocorrer tanto ao redor das próprias igrejas como dentro delas. Naquela época, a preocupação maior com os sepultamentos era quanto aos contaminantes atmosféricos, uma vez que os corpos em putrefação exalam fortes odores, que acarretam, normalmente, uma repulsa da população (PACHECO, 2012). Existem evidências de que poços de captação de água, localizados próximos às igrejas, tiveram a qualidade das suas águas comprometidas, sendo, inclusive, associadas a disseminação de doenças, como o tifo e a peste negra (SILVA e MALAGUTTI, 2008).

Diante desse cenário de contaminação, médicos e higienistas preocupados com a saúde da população propuseram que os cemitérios fossem deslocados para as periferias das cidades e que fossem criadas leis que garantissem que novos cemitérios fossem instalados distantes dos centros urbanos (PACHECO, 2012). Porém, com o crescimento frenético das cidades, os cemitérios acabaram sendo reincorporados aos ambientes urbanos, trazendo, novamente, esses locais de contaminação para o convívio da população (SILVA e MALAGUTTI, 2008).

Os tipos de cemitério mais comuns da atualidade são os cemitérios horizontais e os cemitérios verticais, sendo que nos primeiros os corpos são dispostos em urnas mortuárias, geralmente de madeira, que são enterradas, ficando então, diretamente sobre a influência do solo. Em contrapartida, nos cemitérios verticais, os corpos também ficam dispostos em urnas de madeiras, mas são alocados de forma sobreposta, sem contato direto com o solo. Este último tipo tem como vantagem a diminuição do espaço necessário para a instalação desses empreendimentos e a consequente maximização da vida útil dos cemitérios (PACHECO, 2012; FERRARI *et al*, 2015; NECKEL, 2017).

O sepultamento em cemitérios horizontais tem como principal vantagem o menor tempo de decomposição dos corpos, uma vez que a maior aeração propicia melhores condições biológicas para a decomposição. No entanto, esses tipos de necrópole ocupam maiores territórios, pois se expandem apenas horizontalmente, ao contrário dos cemitérios verticais (FERRARI *et al*, 2015;). Do ponto de vista da contaminação ambiental, ambos podem causar impactos, principalmente se não atenderem ao que é previsto pela legislação vigente. Contudo, ainda assim, os cemitérios verticais apresentam vantagens sobre os horizontais, justamente pela distância dos corpos, em relação ao solo, e pela possibilidade de tratamento dos gases produzidos durante a decomposição dos corpos. Sendo assim, os cemitérios horizontais são os mais preocupantes, sendo que os subprodutos danosos da decomposição cadavérica entram em contato diretamente com o solo, podendo disseminar e contaminar os recursos hídricos, prejudicando não apenas o meio ambiente, mas também a população que vive no entorno dos cemitérios (OLIVEIRA *et al*, 2012; FERRARI *et al*, 2015; NECKEL, 2017).

1.3. Necrochorume

Como amplamente discutido, o necrochorume é a principal causa da contaminação ambiental proveniente de cemitérios, sendo que sua produção e liberação ocorrem a partir do processo de putrefação cadavérica. O necrochorume apresenta coloração castanho-acinzentada, é mais viscoso que a água e é composto por 60% de água, 30% de sais minerais e 10% de substâncias orgânicas (OLIVEIRA *et al.*, 2012), conforme indicado na figura abaixo. Estima-se que, para cada quilo de massa corpórea, ocorra a liberação 0,6 L desse líquido. Existem evidências que esse composto seja exsudado até 2,5 anos após o sepultamento (SILVA e MALAGUTTI, 2009; PACHECO, 2012).

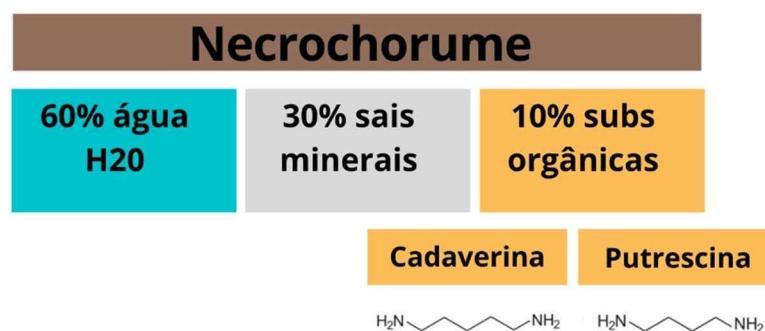


Figura 2: Composição do Necrochorume. Fonte: Adaptado de Bortolassi, 2012.

Dentre as substâncias orgânicas presentes no necrochorume, destacam-se as aminas biogênicas cadaverina e putrescina (Figura 2), substâncias estas responsáveis pelo odor fétido característico desse líquido. Essas aminas, produzidas pela descarboxilação dos aminoácidos lisina e arginina, respectivamente, apresentam baixo peso molecular, e são naturalmente encontradas em todas as células vivas, em concentrações micromolares. Elas desempenham importantes funções biológicas, como a interação com o DNA, que neutraliza a sua carga negativa e permite uma maior condensação dessa molécula, além de serem também importantes durante os processos de divisão e diferenciação celular (UNAL, PALAVAN-UNSAL e TUFEKCI, 2008). Contudo, a cadaverina e a putrescina de origem exógenas são potencialmente tóxicas.

Estudos realizados com as aminas cadaverina e putrescina revelaram que essas induziram diminuição do índice mitótico e o aparecimento de aberrações cromossômicas em células do bioindicador *Allium cepa* (UNAL, PALAVAN-UNSAL e TUFEKCI, 2008) e efeitos citotóxicos em culturas celulares de adenocarcinoma humano (HT-29) (DEL RIO *et al*, 2019). O aporte exógeno dessas aminas biogênicas, conferido pelo consumo de alimentos contaminados com essas substâncias, (principalmente peixes e derivados de leite), em geral ocorre em concentrações superiores às encontradas, naturalmente, no organismo humano e está relacionado ao aumento do débito cardíaco, travamento e paralisia de extremidades, vasodilatação, hipotensão e braquicardia (LADERO *et al* 2010). Neste contexto, Del Rio *et al*. (2019) alertam para a necessidade de uma revisão na legislação sobre as concentrações limite das aminas biogênicas em alimentos. Além disso, de acordo com Neckel *et al* (2017), a partir da degradação das aminas biogênicas cadaverina e putrescina são liberados NH_4^+ (amônia), NO_2^- (nitrito) e NO_3^- (nitrato), os quais, em altas concentrações, induzem efeitos tóxicos aos seres humanos.

A liberação de necrochorume, que ocorre nos cemitérios, pode ser considerada uma fonte de contaminação ambiental (PACHECO, 2012; SILVA E MALAGUTTI, 2009) por agentes potencialmente citogenotóxicos, uma vez que esse líquido contém as aminas biogênicas cadaverina e putrescina, que apresentam esse tipo de toxicidade (UNAL, PALAVAN-UNSAL e TUFEKCI, 2008; DEL RIO *et al*, 2019). Como citado anteriormente, além dos compostos derivados da decomposição do corpo sepultado, existe ainda outras substâncias químicas potencialmente poluidoras, que são derivadas tanto de atividades cerimoniais do sepultamento como de outros elementos envolvidos na decomposição, como por exemplo os produtos químicos provenientes da embalsamação do corpo (formol), dos tratamentos do doente, antes

de sua morte (quimioterápicos) e da carga microbiológica proveniente do corpo em decomposição. Desta forma, todos esses contaminantes podem colocar em risco a saúde ambiental, da população do entorno dos cemitérios e dos trabalhadores envolvidos com os sistemas funerários (SILVA E MALAGUTTI, 2009; KEMERICH *et al*, 2012, ŻYCHOWSKI, J e BRYNDAL, 2015; NECKEL *et al* 2017).

1.4. Decomposição Cadavérica

A produção do necrochorume é decorrente de processos transformativos destrutivos, que ocorrem durante a decomposição cadavérica. O processo se inicia logo após a morte do indivíduo e é dependente da ação de bactérias, geralmente as que compõem a flora intestinal do cadáver. Sabe-se que o tempo necessário para decomposição do corpo pode variar (PACHECO, 2012; NECKEL *et al*, 2017). A tabela 1 elenca os fatores capazes de afetar o processo de decomposição cadavérica.

Condições Cadavéricas	Condições Ambientais
Vestimenta	Temperatura
Idade	Umidade
Forma	Composição do solo
Conteúdo gastrointestinal	PH do solo
Doenças/ estado patológico	Fluxo de ar
Causa da morte	Insetos, microrganismos

Tabela 1: Fatores que afetam a decomposição cadavérica. Fonte: Adaptado de IOAN *et al*, 2017

De maneira geral, o processo de decomposição cadavérica se inicia entre 48 e 72 horas após a morte, dependendo das condições cadavéricas e ambientais. Primeiramente, ocorre a autólise, que é o processo de autodestruição enzimática das células do corpo. Tal destruição promove o extravasamento dos conteúdos celulares (fase fresca); em seguida, ocorre a decomposição do tecido mole (putrefação), graças a ação das bactérias aeróbicas e anaeróbicas liberadas. Após a ruptura da membrana das células do intestino, ocorre a desintegração e liquefação dos tecidos moles (fase efisematosa); posteriormente ocorre a liberação de CO₂ (entre outros gases) e de necrochorume ao meio, devido ao rompimento da pele (fase coliquativa). Em regiões do corpo com maior percentual de triglicerídeos, ocorre formação de uma camada de ácidos graxos insaturados, que são convertidos em saturados por ação de

enzimas bacterianas, promovendo a cristalização e a solidificação do tecido. Com isso, o tecido fica endurecido, mantendo a forma inicial do mesmo (fase de saponificação) (FRANÇA, 2017; IOAN *et al* 2017; ANTONIO *et al.*, 2017; DENT, FORBES e STUART, 2004; FIEDLER e GRAW, 2003).

Posteriormente, por volta de 3 a 5 anos após a morte, os ossos passam a desintegrar-se, sem a liberação de necrochorume (fase de esqueletização) (FRANÇA, 2017; ANTONIO *et al.*, 2017; DENT, FORBES e STUART, 2004). Só após a finalização do processo de decomposição, é que pode ser realizada a exumação ou o desenterramento de corpo sepultado (Resolução-SS-28/2013, item 13.1, do Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo), que é o momento no qual os restos mortais são retirados da sepultura. Essa mesma Resolução citada acima disciplina que o prazo mínimo para a exumação de corpos é de 3 (três) anos para adultos, contados da data do óbito, e de 2 (dois) anos para crianças de até seis anos. Só após esse período, a cova poderá ser reutilizada para um novo sepultamento.

A umidade é um dos fatores que afeta o processo de decomposição cadavérica, sendo que, quando um cemitério é instalado em terrenos sujeitos a inundações por água da chuva ou por água subterrânea, como é o caso de cemitério objeto de estudo do presente trabalho, ocorre um processo de preservação dos corpos denominado de saponificação. Na saponificação, os corpos ficam envolvidos por uma espécie de cera de cor amarelo-esbranquiçada, de aspecto mole e gorduroso, que lembra sabão, denominada de adipocere (WIDYA, 2012). A adipocera é o produto de decomposição constituído, predominantemente, de ácidos graxos saturados, resultante da hidrólise e hidrogenação de gorduras neutras do organismo (FORBES, STUART e DENT, 2005). Quando os corpos sepultados são mantidos sob umidade, eles podem alterar as condições ambientais, além de propiciar a proliferação de bactérias e vírus, que contaminarão os recursos hídricos (PACHECO, 2012; FRANÇA, 2017). Além disso, a saponificação prejudica a administração dos cemitérios, pois, como os corpos saponificados não progridem na decomposição, eles não chegam à fase de esqueletização, o que impede que reutilização das covas. A figura 3 ilustra dois casos de sepulturas em que ocorreria a prolongação do processo de saponificação, devido às condições de inundação e umidade das sepulturas, sendo que as condições ambientais da ilustração se assemelham às condições dos pontos 1 e 2, avaliados no presente trabalho

Ilustração de sepulturas em condições de inundação e umidade.

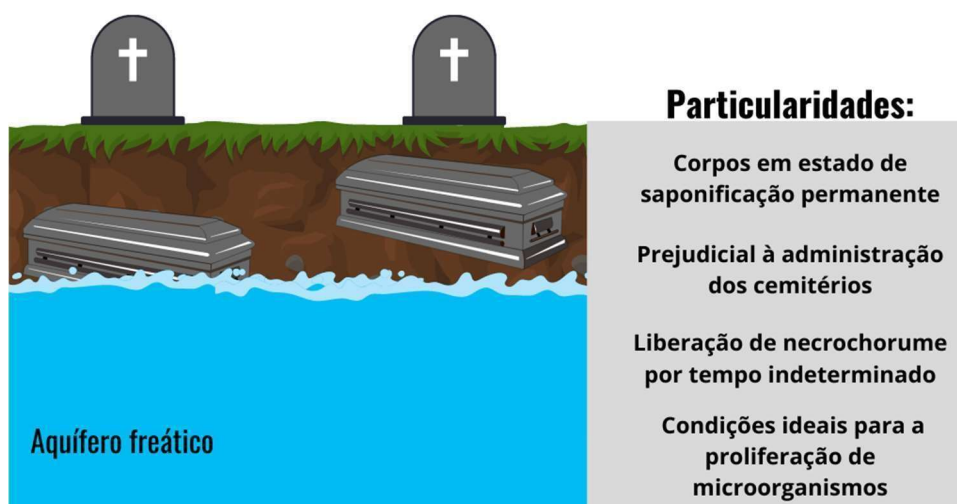


Figura 3: Sepulturas em condições ambientais de inundação e umidade. Fonte: autoria própria

1.5. Legislação Ambiental e a situação atual dos cemitérios no Brasil

No Brasil, a resolução CONAMA 368 (28 de março de 2006), que dispõe sobre a necessidade de licenciamento ambiental para a instalação de cemitérios, determina que seja respeitada uma distância mínima de 1,5 metros entre o nível inferior das sepulturas e o nível mais elevado do lençol freático, considerando as estações de cheias, ou que os sepultamentos sejam feitos em nível superior ao do terreno. No caso de cemitérios instalados em áreas onde existe manancial utilizado para abastecimento público, prevê-se que a área de implantação do cemitério deva estar a uma distância segura de corpos d'água superficiais e subterrâneos, e que tanto o interior do cemitério como as suas imediações disponham de sistema de drenagem adequado. Além disso, há uma recomendação para que se utilizem urnas biodegradáveis e que não sejam utilizados plásticos, tintas, vernizes e outros materiais danosos ao meio ambiente.

A Resolução CONAMA nº 402, de 17 de novembro de 2008, revisa a legislação anterior (CONAMA 355/03), dispondo sobre a necessidade de que órgãos ambientais estaduais e municipais apresentassem, até 2010, critérios de adequação para os cemitérios irregulares e apresentassem um “Plano de Encerramento de Atividades”, com o objetivo de elencar as medidas de recuperação do passivo ambiental deixado por esses empreendimentos (recuperação de área atingida). A legislação ainda dispõe que os cemitérios construídos mais recentemente

devem, além de atender ao disposto na legislação ambiental vigente, realizar Estudo de Impacto Ambiental e Relatório de Impacto Ambiental (EIA-RIMA) exigidos, para assegurar um menor risco de contaminação ambiental (KEMERICH *et al.*, 2014).

De acordo com Silva *e al.* (2006), muitos cemitérios brasileiros se encontram em situações irregulares no Brasil, pois foram construídos sem planejamento ambiental e sem passar pelo processo de licenciamento. Além disso, de acordo com Nascimento (2020), 15% a 20% dos cemitérios brasileiros estão, comprovadamente, envolvidos com contaminação do subsolo e da água subterrânea. Por essa razão, alguns autores apontam a necessidade de os cemitérios serem amplamente avaliados, para que se possa diagnosticar, planejar e propor alternativas para o enfrentamento dos impactos que esses ambientes promovem tanto ao ambiente edáfico como aquático (águas subterrâneas e superficiais). Os autores destacam ainda a urgência de avaliações que estimem os riscos à saúde humana (JONKER, OLIVIER, 2012; AMUNO, 2013; PAÍGA, DELERUE-MATOS, 2016). A comunidade científica propõe também a instauração de políticas públicas mais rígidas, para solucionar os sérios problemas ambientais e de saúde pública envolvidos com as instalações e a operação dos cemitérios (MARCOMINI e CASTRO, 2010; NECKEL *et al.* 2017).

1.6. Avaliação de contaminação ambiental de solos

A contaminação de solos, por não ser facilmente visualizada, é considerada como um “perigo escondido” (RODRIGUÉZ-EUGENIO, MCLAUHLIN e PENNOCK, 2018). Um dos procedimentos mais utilizados para avaliar a toxicidade do solo é por meio da análise de extratos solubilizados. A solubilização consiste em adicionar água isenta de contaminantes em amostras de solos, agitar, deixar decantar e filtrar essa mistura. O líquido obtido nesta filtragem é o extrato solubilizado do solo amostrado. Este extrato, que contém as substâncias hidrossolúveis presentes no solo amostrado, é então utilizado em bioensaios para avaliar a toxicidade dos solos coletados (ABNT NBR 10.006, 2004; SISINNO, 2003).

A avaliação de contaminantes edáficos pode ser feita por meio de análise química de amostras de solos e por meio de bioensaios realizados com essas amostras. As análises químicas são importantes métodos de avaliação qualitativa e quantitativa dos compostos presentes em uma amostra. Já os bioensaios permitem avaliar os impactos que os contaminantes presentes em uma amostra podem promover no meio biológico, permitindo assim avaliar os efeitos dos compostos sobre a biota e sobre a saúde humana. Por essa razão, os bioensaios vem ganhando cada vez mais espaço nas avaliações de contaminação e caracterização de impactos de áreas

contaminadas (BANKS e SCHULTZ, 2005; LEITGIB, KÁLMÁN e GRUIZ, 2007). Gómez-Sagasti *et al* (2016) afirmam que os bioensaios realizados com modelos vegetais oferecem resultados mais completos sobre o comprometimento ambiental do que as análises físico-químicas, pois estas últimas apenas certificam a presença do contaminante em uma dada amostra ambiental e não os seus possíveis efeitos sobre a biota.

Os bioensaios são realizados com bioindicadores de diversas categorias taxonômicas, que vão desde microrganismos até linhagens celulares de diferentes organismos e órgãos, que possam ser alvo da ação de um agente químico. A utilização de bioensaios vem sendo cada vez mais incentivada por permitir a detecção de níveis de contaminação mais baixos dos que aqueles que seriam detectáveis em análises físico-químicas (BANKS e SCHULTZ, 2005). Esses ensaios, por considerarem as interações entre os contaminantes, a matriz ambiental e a biota (LEITGIB, KÁLMÁN e GRUIZ, 2007), são capazes de avaliar as consequências da exposição de organismos vivos às amostras complexas. Os bioensaios permitem, ainda, estimar como a combinação de poluentes presentes no ambiente pode afetar os organismos vivos (IQBAL, *et al*, 2019).

1.6.1. Uso de bioindicadores vegetais

Os bioindicadores são definidos como espécies que refletem as condições da qualidade do habitat a que estão expostos (STORK e SAMWAYS, 1995). Leitgib, Kálmán e Gruiz (2007) afirmam que a escolha dos bioindicadores a serem usados em avaliações da toxicidade de solo deve priorizar espécies que representem esse ecossistema. Nesse sentido, os bioindicadores vegetais são particularmente indicados, para se avaliar a toxicidade de contaminantes presentes nesta matriz ambiental, pois são sistemas biológicos altamente relacionados a esses ambientes (BANKS e SCHULTZ, 2005). Esses bioindicadores, além de serem eficientes para avaliar a fitotoxicidade de uma amostra ambiental, também permitem estimar os efeitos citogenotóxicos e mutagênicos provocados pela exposição a um contaminante ambiental. Neste contexto, os bioindicadores vegetais, especificamente plantas vasculares, são considerados excelentes modelos para serem usados em monitoramento da contaminação ambiental (GRANT, 1994; LEME e MARIN-MORALES, 2009; IQBAL *et al*, 2019).

A utilização de plantas vasculares em ensaios toxicológicos apresenta diversas vantagens, entre elas: ser um método simples, rápido e facilmente reprodutível; de baixo custo; alta viabilidade das sementes; e baixa quantidade de amostra necessária (LEME e MARIN-MORALES, 2009; IQBAL *et al*, 2019;). Dentre os organismos vegetais usados como

bioindicadores de poluição ambiental, se destacam a espécie *Lactuca sativa*, que é altamente utilizada em avaliações do potencial fitotóxico de ambientes contaminados, e a espécie *Allium cepa*, que responde com muita eficiência aos efeitos citogenotóxicos e mutagênicos de compostos químicos e de amostras ambientais.

1.6.2. *Lactuca sativa*

O uso da espécie *L. sativa* para a avaliação de fitotoxicidade é recomendada por diversas agências internacionais reconhecidas de meio ambiente, como a Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos (US EPA, 1994) e a Organização para Cooperação e Desenvolvimento (OECD, 2003). Esse bioindicador é utilizado mundialmente, devido à sua sensibilidade aos compostos químicos tóxicos.

Rede *et al.*, (2016) utilizaram o teste de fitotoxicidade com *L. sativa* para avaliar a eficiência de processos de biorremediação, Bancks e Schultz (2005) chamam a atenção para a eficácia desse modelo vegetal em avaliações de amostras ambientais contendo contaminantes complexos, formados pela mistura de diversas substâncias, à exemplo do petróleo. Esse teste vem sendo descrito por alguns autores como um modelo eficiente, sensível, barato, rápido e de fácil reprodução (PALMIERI *et al.*, 2014 e CHAN-KEB *et al.*, 2018). Além disso, Valerio, Garcia e Peinado (2007) afirmaram que o teste permite identificar diferentes níveis de fitotoxicidade de amostras, sendo importante ferramenta a ser aplicada para caracterizar áreas com alta contaminação.

Nos bioensaios com *L. sativa* são avaliados os efeitos de um dado agente tanto sobre a germinação das suas sementes como sobre o desenvolvimento das radículas e hipocótilos. A fitotoxicidade de uma amostra é medida pela sua capacidade de inibir a germinação de sementes e o comprimento das radículas e hipocótilos (SOBRERO e RONCO, 2008). A inibição da germinação se caracteriza como uma avaliação inicial dos efeitos tóxicos agudos, provocados por uma determinada substância. Estudos realizados por Maila e Cloete (2002) mostraram que alguns contaminantes metálicos, presentes em amostras de solo, foram capazes de inibir as taxas de germinação de *L. sativa*, resultados esses que podem ser considerados como indicadores da fitotoxicidade desses agentes químicos.

Esse bioindicador ainda permite inferir se um agente apresenta fitotoxicidade, mesmo quando não houve interferência significativa nos seus parâmetros de germinação. Uma outra abordagem que pode ser feita para avaliar a fitotoxicidade, pelo sistema teste *L. sativa*, é por meio de ensaios de alongamento das radículas e dos hipocótilos das sementes germinadas. Young *et*

al (2012) verificaram diferenças significativas entre o alongamento das radículas de *L. sativa* expostas a efluentes de biorreatores anaeróbicos e as expostas em solo não contaminado.

Os desenvolvimentos do hipocótilo e da radícula são fundamentais para à sobrevivência de uma planta, uma vez que estão relacionados com a capacidade do vegetal se estabelecer e de desenvolver no ambiente. Assim, alterações nestes parâmetros podem ser indicativos da presença de compostos que perturbam o desenvolvimento da planta, considerados, então, com agentes fitotóxicos (SOBRERO e RONCO, 2008). Esses parâmetros também podem estar associados com a inibição ou diminuição da divisão celular, portanto podem também indicar a potencialidade citotóxica do agente indutores (MARCANO *et al*, 2004; IQBAL, *et al*, 2019).

1.6.3. *Allium cepa*

A espécie *A. cepa* é comumente usada para avaliar a citogenotoxicidade e a mutagenicidade de compostos químicos puros ou em misturas, bem como de amostras ambientais complexas, por isso muito utilizada para avaliar solos contaminados. Esse bioindicador está entre os indicados por agências governamentais internacionais, como EOCB e USEPA, para ser usado em avaliações do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de contaminantes ambientais. De acordo com Leme e Marin-Morales, (2009), essa espécie apresenta vantagens para ser usada em avaliações citogenotóxicas e mutagênicas, devido às suas características cromossômicas, como tamanho grande e número reduzido ($2n = 16$), o que facilita a visualização de danos cromossômicos e alterações no ciclo mitótico induzidos pela substância ou amostras em estudo. As autoras ainda citam que essa espécie apresenta vantagens adicionais para serem usadas em avaliações de citogenotoxicidade e mutagenicidade por caracterizarem ensaios de fácil desenvolvimento, baixo custo e altamente reprodutíveis. Além disso, esse vegetal possui grande sensibilidade a substâncias químicas (WHITE e CLAXTON, 2004 e LEME e MARIN MORALES, 2009).

Cotelle, Masfaraud e Férard (1999) utilizaram a espécie *A. cepa* para avaliar a genotoxicidade de solos contaminados por resíduos de atividades industrial e de produção de combustível. Com esse estudo, os autores confirmaram a eficiência desse bioindicador para ser usado em biomonitoramento ambiental. De Souza, Da Costa e Vargas (2013) também atestaram a efetividade do teste de *A. cepa* para avaliar o potencial genotóxico de substratos contaminados por metais.

Os agentes citogenotóxicos são enquadrados como uma classe preocupante de poluentes, por colocarem em risco, não só a saúde dos organismos expostos, mas também a saúde de seus descendentes, já que as alterações no DNA podem ser transmitidas através das gerações (RIBEIRO, SALVADORE e MASQUES 2003). Rank e Nilsen (1997) afirmam que compostos que induzem danos ao DNA de uma espécie tem possibilidade de reagir, igualmente, com o DNA de outros organismos.

De acordo com Leme e Marin Morales (2009), os resultados obtidos com *A. cepa* apresentam boa correlação com testes realizados com outros organismos, como, por exemplo, os de mamíferos. Um exemplo disso é que há uma correlação de 82% entre o teste de *A. cepa* e o teste de carcinogênese em ratos, dados estes que atestam a efetividade dos ensaios realizados com esse modelo vegetal (RANK e NIELSEN, 1997). Fiskesjo (1985) afirma que as respostas obtidas nos testes de *A. cepa* foram semelhantes aos obtidos com linfócitos humanos, podendo, assim, ser considerado um teste que pode indicar se o agente estudado oferece riscos ao ambiente e à saúde humana.

O necrochorume liberado da decomposição cadavérica é uma fonte abundante e contínua de contaminação ambiental. Essa informação já indica uma necessidade de se avaliar, mais detalhadamente, os impactos que as atividades cemiteriais podem promover tanto ao ambiente como à saúde humana. Para se estimar os riscos ocupacionais relacionados a essas atividades, bem como os possíveis impactos à saúde humana, devem ser, primeiramente, realizados bioensaios com amostras de solos coletadas nesses ambientes. A necessidade dessa avaliação se dá pelo fato de que muitas doenças, como o câncer, doenças degenerativas (Alzheimer e Parkinson), cardiovasculares e inflamatórias, além de infertilidade e síndromes metabólicas, podem estar associadas à ação de substâncias com potencial genotóxico (TURKEZ, *et al.*, 2017), que induzem danos não reparáveis no DNA (JACKSON E BARTEK, 2009).

O cemitério municipal São João Batista da cidade de Leme-SP (22°19'22''S (Lat.) e 47°40'93''W (Long.) está instalado em uma área de 67.706,86 m², onde boa parte das suas sepulturas estão continuamente inundadas por águas freáticas. A inundação das covas atinge, em média, 5 cm de altura do corpo sepultado, nível este que pode ser ainda aumentado nos períodos de chuva. Toda essa área inundada apresenta problemas, quanto ao tempo de degradação dos corpos, pois os mesmos permanecem, indefinidamente, em um estágio de decomposição denominado de saponificação. Essa característica local, além de afetar a biota

do solo, afeta também os procedimentos de exumação dos corpos, fato que pode ser altamente prejudicial para a saúde dos trabalhadores envolvidos com essa prática.

O presente trabalho avaliou a fitotoxicidade, citogenotoxicidade e o potencial mutagênico de solubilizados de amostras de solo coletadas no cemitério municipal São João Batista da cidade de Leme-SP por meio de ensaios realizados com os bioindicadores vegetais *L.sativa* e *A.cepa*. Para este estudo de caso foram avaliados solos de três ambientes distintos: (1). solo de um local onde a sepultura fica, continuamente inundada por águas do lençol freático. Neste caso, a água fica em contato direto com o corpo saponificado; (2). solo de sepultura que também contém água, mas esta não está em contato direto com o cadáver, mas a unidade do local também mantém o corpo sepultado em estado de saponificação. Nestes dois casos citados, os corpos estavam sepultados há, aproximadamente, doze anos. Para efeito de comparação, também foi coletado (3). solo de uma sepultura situada em uma região sem inundação ou umidade excessiva. A coleta foi realizada a 30 cm de profundidade, aproximadamente, dez dias após o sepultamento.

2. OBJETIVOS:

Neste trabalho foram avaliados a fitotoxicidade, a citogenotoxicidade e o potencial mutagênico de amostras de solos coletados em três sepulturas do cemitério municipal São João Batista (Leme-SP), por meio de ensaios realizados com *A.cepa* e *L.sativa*. Foram avaliadas três diferentes condições de sepultamento deste cemitério: sepultura com toda a área da cova inundada (água em contato com o corpo saponificado); sepultura que contém água, mas esta não está em contato com o cadáver, porém mantém a umidade da área suficiente para conservar o corpo no estado de saponificação (em ambas as sepulturas citadas, o sepultamento ocorreu cerca de 12 anos antes da coleta); e sepultura instalada em área não inundada, cuja coleta foi realizada, aproximadamente, dez dias após o sepultamento, a uma profundidade de cerca de 30 cm.

2.1. Objetivos específicos:

- Realizar coletas de solo em três tipos de sepulturas:
 - Duas sepulturas que contêm cadáveres saponificados: a que contém a água imersa junto ao corpo; e a que contém água, mas sem estar em contato com o corpo sepultado;
 - Uma sepultura que recebeu recentemente um cadáver e cujo terreno não se encontra encharcado. A coleta foi realizada a 30 cm de profundidade;

- Avaliar o potencial fitotóxico de amostras de solubilizado dos solos coletados nas sepulturas, por meio do teste de germinação e de alongamento da raiz e do hipocótilo, realizados com o bioindicador *L. sativa*;
- Avaliar o potencial citotóxico de amostras de solubilizado de solos coletados nas sepulturas descritas acima, por meio do teste de Índices Mitótico com *A. cepa*;
- Avaliar os potenciais genotóxicos e mutagênicos de amostras de solubilizado de solos coletadas nas sepulturas descritas acima, por meio dos testes de Aberrações Cromossômicas e do Micronúcleo em células meristemáticas de *A. cepa*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostra testada

Para a realização deste estudo, foram coletadas amostras de solo do cemitério São João Batista, no município de Leme-SP. As coletas de solos foram realizadas em dezembro de 2018. O ponto 1 (P1) refere-se a solo de uma sepultura que contém água em contato com o corpo saponificado; o ponto 2 (P2) é referente ao solo de uma sepultura úmida, no qual não há água em contato direto com o corpo, mas há umidade suficiente para a manutenção do processo de saponificação; e o ponto 3 (P3) é relativo a uma sepultura de, aproximadamente, dez dias de sepultamento, cuja profundidade de coleta do solo foi de 30 cm (Figura 4).



Figura 4: A. Ponto 1, sepultura permanentemente inundada (corpo saponificado); B. Ponto 2, sepultura úmida (corpo saponificado); C. Ponto 3, sepultura de aproximadamente 10 dias de sepultamento.

A metodologia de coleta seguiu o protocolo estabelecido pela ABNT NBR 10007/2004. Os solubilizados foram utilizados nos bioensaios de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico, realizados com os bioindicadores *Lactuca sativa* e *Allium cepa*.

3.1.2. Material biológico

Para a realização dos bioensaios, foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* (variedade Gran rapids) e de *Allium cepa* (variedade baia periforme), organismos testes rotineiramente usados no laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção dos extratos solubilizados

Para o preparo do solubilizado das amostras de solo, primeiramente foi necessário obter o peso seco dos solos. Foram pesadas, em cápsulas de porcelana, 10 g de amostras frescas de cada solo coletado. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa (105 °C), por 24 horas, e pesadas novamente. Esse processo foi repetido, até não haver mais variação de peso.

Os solubilizados das amostras foram preparados dissolvendo, em um frasco de 1.500 mL, 250 g de solo (considerando o peso seco do solo referência) em 1000 mL de água ultrapura. As soluções foram agitadas, continuamente, em baixa velocidade, por 5 minutos. Após 7 dias de descanso (temperatura de 25 °C), as soluções foram filtradas (membrana de 0,45 µm) e os solubilizados utilizados nos bioensaios. Para cada amostra de solo foi preparado um solubilizado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.2. Teste de fitotoxicidade com *Lactuca. sativa*

A fitotoxicidade dos solubilizados dos solos coletados no cemitério São João Batista foi avaliada por meio dos testes de germinação e de alongamento de raízes/hipocótilos, realizados com o bioindicador *L. sativa*, conforme descrito por Sobero e Ronco (2004). 20 sementes de *L. sativa* foram dispostas em placa de Petri forradas com papel de filtro. As placas foram umedecidas com 4 mL dos solubilizados previamente preparados. O controle negativo (CN) foi realizado com água deionizada e o controle positivo (CP) com a solução de ZnSO₄ a 0,05M (SOBRERO e RONCO, 2004). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As placas de Petri com as sementes foram incubadas em BOD, sem fotoperíodo, a 22 °C, por 120 horas. Após o período de incubação, foram contabilizadas as sementes germinadas. Em seguida, as placas

contendo as plântulas foram congeladas, para facilitar a mensuração dos comprimentos das raízes e dos hipocótilos. Todas as medidas foram tomadas com o auxílio de um paquímetro digital. Posteriormente, as médias dos resultados das mensurações de cada placa/tratamento e do CP foram comparadas com as do CN. A figura 5 traz um fluxograma que demonstra esse processo.

Condições de Germinação:

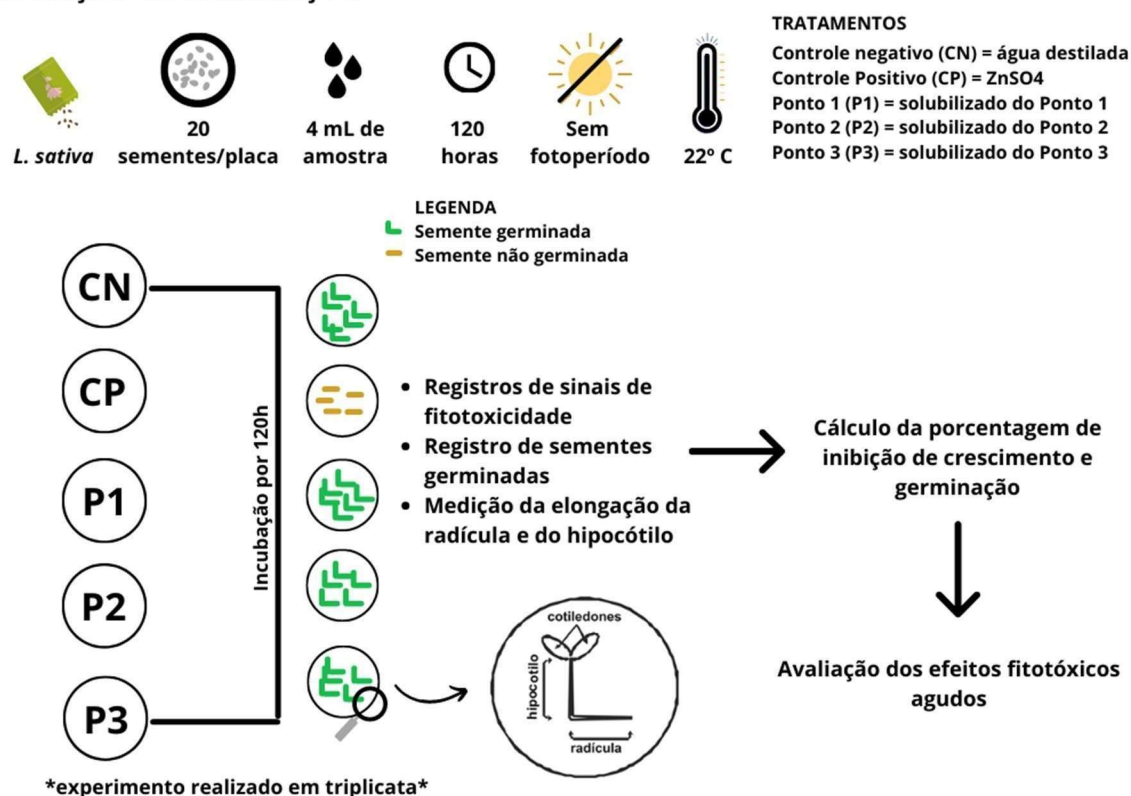


Imagem 5: Fluxograma do Bioensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*.

Fonte: Adaptado de Sobero e Ronco (2004)

3.3.2. Teste de citogenotoxicidade e mutagenicidade com *Allium cepa*

A citogenotoxicidade e mutagenicidade das amostras dos solos coletados foram avaliadas pelo ensaio de *A. cepa*, seguindo as descrições de Grant (1982), com algumas modificações, como segue: Cem sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido com 5mL dos solubilizados das amostras de solo de P1, P2 e P3. O CN foi realizado com água deionizada e o CP com solução aquosa do herbicida trifluralina (droga de ação aneugênica), na concentração de 0,84ppm de princípio ativo (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, 2009) e com Metil metanosulfonato (MMS) (droga de ação clastogênica), na concentração de $4 \cdot 10^{-4}M$ (BERANEK, 1990). As placas foram dispostas em BOD, com fotoperíodo de 12 horas, por 5 dias (aproximadamente 120 horas), ou até que as raízes germinadas atingissem cerca de 2 cm de comprimento. A coleta foi realizada próxima às 12:00 horas, por ser o momento em que as células meristemáticas apresentam-se com maior índice de divisão. Na sequência, foi realizada a contagem do número de sementes germinadas.

As radículas foram coletadas e fixadas em Carnoy (álcool: ácido acético, na proporção 3:1 – v:v) e armazenadas a 4 °C, até o momento da confecção das lâminas. Todos os ensaios com esse organismo testem foram realizados em triplicata.

Para a confecção das lâminas, as radículas passaram por três banhos de 5 minutos cada em água deionizada. Na sequência, as radículas foram hidrolisadas em HCl 1N a 60 °C, por 10 minutos, seguido de três novos banhos de 5 minutos cada em água. Na sequência, as sementes foram transferidas para vidros âmbar contendo reativo de Schiff e colocadas em ambiente escuro, por 2 horas. Após esse período, foram feitos mais três banhos em água de osmose, para retirada do excesso do reativo de Schiff.

Para a confecção das lâminas, as regiões meristemáticas das radículas foram seccionadas e dispostas em lâminas contendo uma gota de carmim acético (2%). Esse corante foi utilizado para contra corar o citoplasma e melhorar a visualização dos limites celulares. O material foi recoberto com lamínula e suavemente esmagado, para garantir o perfeito espalhamento das células. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido (LN2) e as lâminas deixadas a temperatura ambiente, por ~48 horas, para secagem. Em seguida, foi adicionado uma gota de resina sintética sobre o material biológico das lâminas e este foi, imediatamente, recoberto com uma nova lamínula. Após a secagem da resina, as lâminas foram analisadas em microscopia de luz (Figura 6 - fluxograma das etapas do ensaio com *A. cepa*).

Condições de Germinação:



TRATAMENTOS:

Controle Negativo (CN) = água destilada
 Controle Positivo 1 (CP1) = trifluralina
 Controle Positivo 2 (CP2) metil metanosulfato
 Ponto 1 (P1) = solubilizado do Ponto 1
 Ponto 2 (P2) = solubilizado do Ponto 2
 Ponto 3 (P3) = solubilizado do Ponto 3

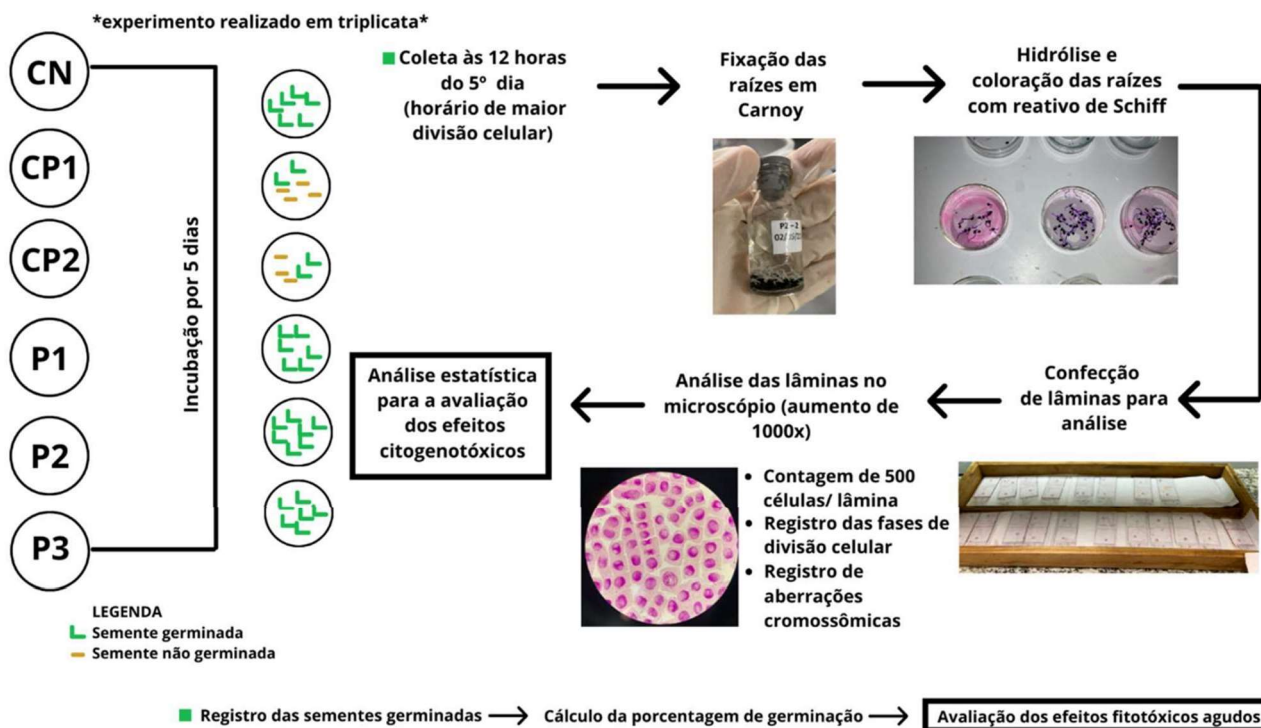


Figura 6: Fluxograma dos bioensaios de fitotoxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade com *A. cepa*

Fonte: Autoria própria

3.3.3. Análises estatísticas dos resultados

Para avaliar o nível de significância dos resultados, os dados obtidos nos ensaios de *L. sativa* e *A. cepa* foram submetidos a análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 8. Os dados de ambas, *L. sativa* e *A. cepa*, foram analisadas pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e pelo teste de homogeneidade de Brown–Forsythe, por se assemelhar ao teste de homogeneidade de variância de Levene (WANG *et al.*, 2017), seguido do teste paramétrico ANOVA ou não paramétrico Kruskal Wallis. Todas as análises foram realizadas para comparação dos resultados com os do CN, com 95% de nível de confiança.

4. RESULTADOS

O bioindicador *L. sativa* foi utilizado para avaliar a ação fitotóxica dos solubilizados testados. Pelo ensaio de germinação realizado com *L. sativa*, não foram registradas diferenças estatisticamente significativas, entre os tratamentos com os solubilizados dos solos coletados nos pontos 1, 2 e 3 e o controle negativo (CN), conforme pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2: Porcentagem de germinação das sementes de *Lactuca sativa* expostas aos solubilizados dos solos coletados nos pontos 1, 2 e 3 e aos controles negativo e positivo.

Tratamento	% de Germinação		
	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3
CN	80	95	75
CP	80	95	75
Ponto 1	95	90	85
Ponto 2	75	90	85
Ponto 3	80	65	70

CN: controle negativo (água deionizada); CP: controle positivo – CP (ZnSO₄ - Sulfato de Zinco); Ponto 1: solubilizado de solo do ponto 1, no qual a sepultura permanece constantemente inundada; Ponto 2: exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 2, no qual a sepultura permanece em estado de alta umidade; Ponto 3: exposição das sementes em solubilizado do ponto 3, no qual havia ocorrido um sepultamento 10 dias antes da coleta.

Em relação aos índices de alongação de hipocótilo de *L. sativa*, também não foram verificadas diferenças significativas entre o CN e os extratos solubilizados dos pontos 1, 2 e 3, conforme indicado na tabela 3.

Por fim, em relação aos índices de alongação da radícula de *L. sativa*, as sementes expostas ao solubilizado do Ponto 2 (sepultura permanece em condições de alta umidade e o corpo encontra-se saponificado) exibiram resultados que diferiram significativamente dos observados no CN. Com relação aos Pontos 1 e 3, não foram observadas diferenças significativas, conforme pode ser observado na tabela 3 e no gráfico 1.

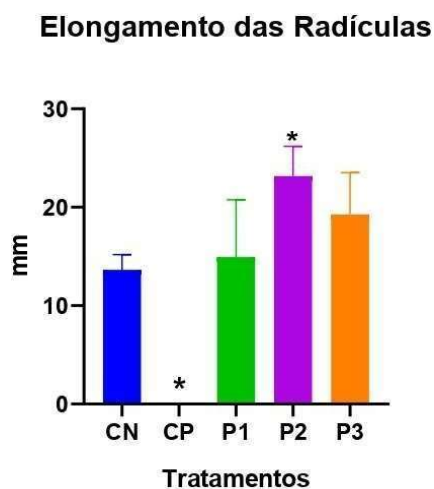
Tabela 3: Alongamento de raízes de *L. sativa*, após exposição aos solubilizados de solo coletado nos pontos 1, 2 e 3, aos controles negativo e positivo.

Tratamento	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)
CN	14,8 ± 9,6	13,4 ± 12,9
CP	1,1 ± 0,2*	0,0*
Ponto 1	13,5 ± 11,2	15,5 ± 12,8
Ponto 2	21,0 ± 11,3	23,0 ± 14,0 *
Ponto 3	16,3 ± 10,74	19,3 ± 15,9

*,

resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$); CN: controle negativo (água deionizada) ; CP: controle positivo (ZnSO₄ - Sulfato de Zinco); Ponto 1: solubilizado de solo do ponto 1, no qual a sepultura permanece constantemente inundada; Ponto 2: exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 2, no qual a sepultura permanece em estado de alta umidade; Ponto 3: exposição das sementes em solubilizado do ponto 3, no qual havia ocorrido um sepultamento 10 dias antes da coleta.

Gráfico 1: Elongamento das radículas após exposição aos solubilizados de solo coletado nos pontos 1, 2 e 3, aos controles negativo e positivo.



*: resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$); CN: controle negativo (água deionizada); CP: controle positivo – CP (ZnSO_4 - Sulfato de Zinco); Ponto 1: solubilizado de solo do ponto 1, no qual a sepultura permanece constantemente inundada; Ponto 2: exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 2, no qual a sepultura permanece em estado de alta umidade; Ponto 3: exposição das sementes em solubilizado do ponto 3, no qual havia ocorrido um sepultamento 10 dias antes da coleta

A figura 7 ilustra o aspecto de desenvolvimento das raízes expostas aos solubilizados dos pontos 1,2 e 3 e aos controles positivo e negativo.

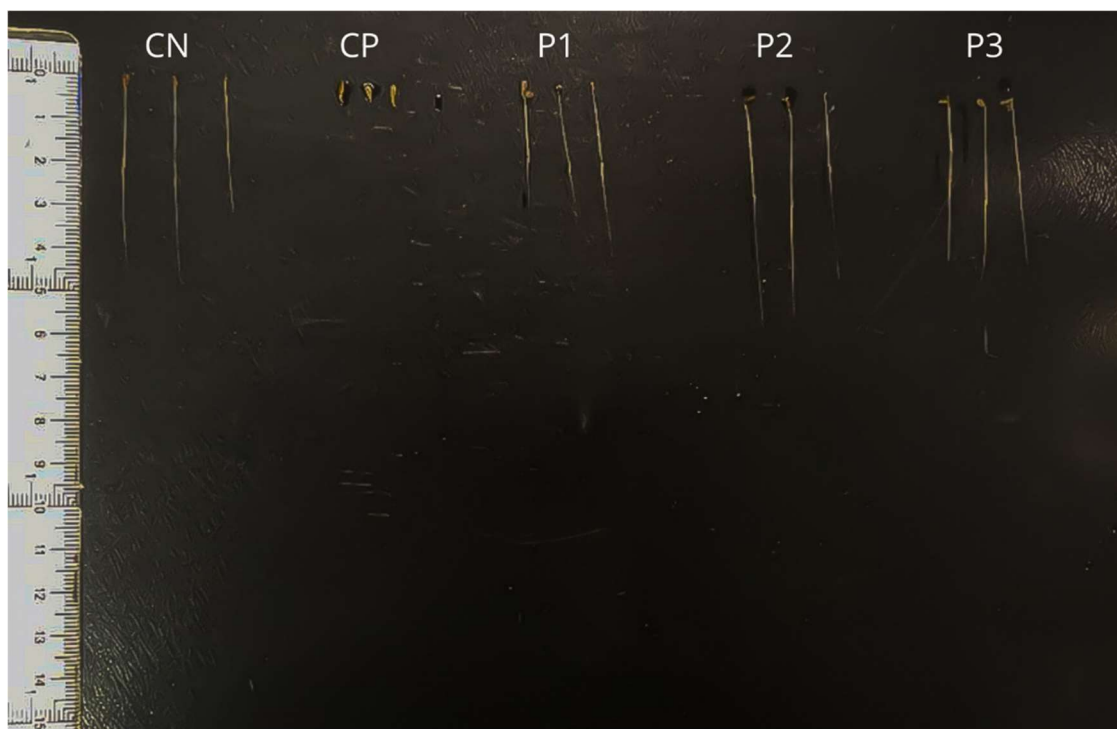


Figura 9: Aspecto do desenvolvimento das raízes, teste de alongamento. CN. Controle negativo (exposição das sementes em água deionizada); CP. Controle positivo (exposição das sementes em ZnSO_4); P1: Ponto 1 (exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 1, no qual a sepultura permanece constantemente inundada); P2. Ponto 2 (exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 2, no qual a sepultura permanece em estado de alta umidade); P3. Ponto 3 (exposição das sementes em solubilizado do ponto 3, no qual havia ocorrido um sepultamento 10 dias antes da coleta).

A porcentagem de germinação também foi avaliada pelo ensaio de *A. cepa*, sendo que neste ensaio também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com os extratos de solubilizados de solo dos pontos 1, 2 e 3 e o CN. As porcentagens de germinação dos ensaios com *A. cepa* estão registradas na tabela 4.

Tabela 4: Porcentagem de germinação das sementes de *A. cepa* expostas aos solubilizados de solo coletado nos pontos 1, 2 e 3, aos controles negativo e positivos.

Tratamento	% de Germinação		
	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3
CN	34	48	50
TRIF	9	33	8
MMS	43	43	35
Ponto 1	52	43	55

Ponto 2	58	56	54
Ponto 3	45	45	32

CN: controle negativo (água deionizada); TRIF: controle positivo 1 (solução aquosa trifuralina); MMS: controle positivo 2 (solução aquosa de Metil metanosulfonato); Ponto 1: solubilizado de solo do ponto 1, no qual a sepultura permanece constantemente inundada; Ponto 2: exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 2, no qual a sepultura permanece em estado de alta umidade; Ponto 3: exposição das sementes em solubilizado do ponto 3, no qual havia ocorrido um sepultamento 10 dias antes da coleta.

4.2. Bioensaio de citogenotoxicidade e mutagenicidade

Os bioensaios realizados para estimar aos efeitos citogenotóxicos e mutagênicos das amostras de solos coletadas no cemitério São João Batista (Leme-SP) foram desenvolvidos com o bioindicador *A. cepa*. Para este estudo, foram avaliadas alterações celulares como micronúcleos, aderências, quebras, pontes e perdas cromossômicas, brotos nucleares, C-metáfases e células poliplóides.

Foram quantificados os índices de citotoxicidade (índice mitótico), de genotoxicidade, de mutagenicidade e de morte celular para cada um dos tratamentos e os resultados foram comparados aos índices observados no controle negativo. Conforme indicado na tabela 5 e gráfico 2, houve redução significativa dos índices mitóticos das células expostas aos solubilizados dos P1, P2 e P3 com relação ao CN.

Pelos ensaios de aberrações cromossômicas realizados com o bioindicador *A. cepa*, foi possível observar que nenhum dos pontos analisados apresentou índice de genotoxicidade significativamente diferente do controle negativo, e que em nenhum dos tratamentos foi observado indícios de morte celular. Contudo, por esse mesmo ensaio, foi possível observar que a amostra coletada no ponto 1 induziu uma formação significativamente maior de células micronucleadas, em relação ao controle negativo, alteração essa que comprova o potencial mutagênico da amostra (Tabela 5, gráfico 3).

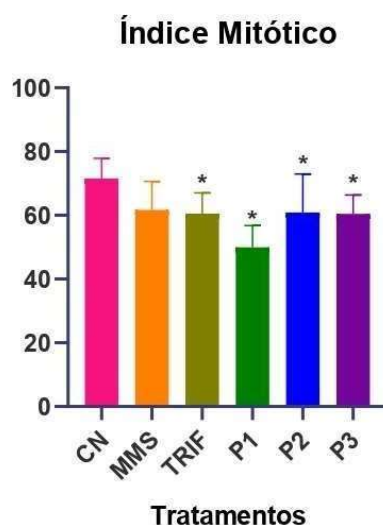
Tabela 5: Resultados dos ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade morte celular, realizadas com o bioindicador *A. cepa*, expostos solubilizados dos pontos 1, 2 e 3, aos controles positivos e ao controle negativo.

Tratamento	Índice Mitótico (citotoxicidade)	Índice de Mutagenicidade	Índice de Genotoxicidade	Índice de Morte Celular
CN	71,56 ± 6,33	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,13	0,00 ± 0,00
MMS	61,68 ± 8,94	3,22 ± 2,63*	0,41 ± 0,44	0,00 ± 0,00
TRIF	60,55 ± 6,47*	0,11 ± 0,19	2,64 ± 0,80*	0,00 ± 0,00
P1	49,93 ± 6,86*	0,18 ± 0,18*	0,24 ± 0,31	0,00 ± 0,00

P2	60,85 ± 12,13*	0,11 ± 0,15	0,13 ± 0,16	0,00 ± 0,00
P3	60,48 ± 5,86*	0,06 ± 0,31	0,06 ± 0,12	0,00 ± 0,00

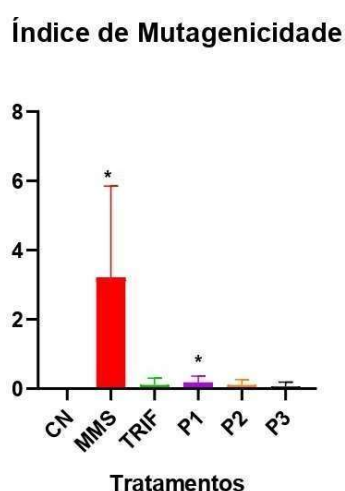
*: resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$); CN: controle negativo (água deionizada); TRIF: controle positivo 1 (solução aquosa trifuralina); MMS: controle positivo 2 (solução aquosa de Metil metanosulfonato); Ponto 1: solubilizado de solo do ponto 1, no qual a sepultura permanece constantemente inundada; Ponto 2: exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 2, no qual a sepultura permanece em estado de alta umidade; Ponto 3: exposição das sementes em solubilizado do ponto 3, no qual havia ocorrido um sepultamento 10 dias antes da coleta.

Gráfico 2: Índices mitóticos observados nos ensaios realizados com o bioindicador *A. cepa*, após exposição das células aos solubilizados de solo coletado nos pontos 1, 2 e 3, aos controles negativo e positivo.



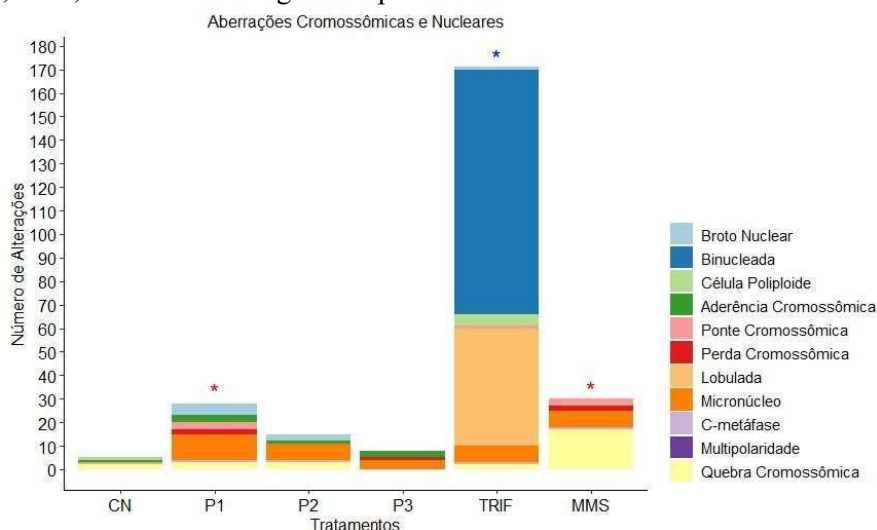
*: resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$); CN: controle negativo (água deionizada); TRIF: controle positivo 1 (solução aquosa trifuralina); MMS: controle positivo 2 (solução aquosa de Metil metanosulfonato); Ponto 1: solubilizado de solo do ponto 1, no qual a sepultura permanece constantemente inundada; Ponto 2: exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 2, no qual a sepultura permanece em estado de alta umidade; Ponto 3: exposição das sementes em solubilizado do ponto 3, no qual havia ocorrido um sepultamento 10 dias antes da coleta.

Gráfico 3: Índices de mutagenicidade observados nos ensaios realizados com o bioindicador *A. cepa*, após exposição das células aos solubilizados de solo coletado nos pontos 1, 2 e 3, aos controles negativo e positivo.



*: resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$); CN: controle negativo (água deionizada); TRIF: controle positivo 1 (solução aquosa trifuralina); MMS: controle positivo 2 (solução aquosa de Metil metanosulfonato); Ponto 1: solubilizado de solo do ponto 1, no qual a sepultura permanece constantemente inundada; Ponto 2: exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 2, no qual a sepultura permanece em estado de alta umidade; Ponto 3: exposição das sementes em solubilizado do ponto 3, no qual havia ocorrido um sepultamento 10 dias antes da coleta.

Gráfico 4: Número de aberrações cromossômicas e nucleares observadas nos ensaios realizados com o bioindicador *A. cepa*, após exposição das células aos solubilizados de solo coletado nos pontos 1, 2 e 3, aos controles negativo e positivo.



*: resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$), em azul: índice de genotoxicidade significativo e em vermelho: potencial mutagênico significativo; CN: controle negativo (água deionizada); TRIF: controle positivo 1 (solução aquosa trifuralina); MMS: controle positivo 2 (solução aquosa de Metil metanosulfonato); Ponto 1: solubilizado de solo do ponto 1, no qual a sepultura permanece constantemente inundada; Ponto 2: exposição das sementes em solubilizado de solo do ponto 2, no qual a sepultura permanece em estado de alta umidade; Ponto 3: exposição das sementes em solubilizado do ponto 3, no qual havia ocorrido um sepultamento 10 dias antes da coleta

As aberrações cromossômicas observadas durante a contagem das lâminas encontram-se registradas da Figura 8.

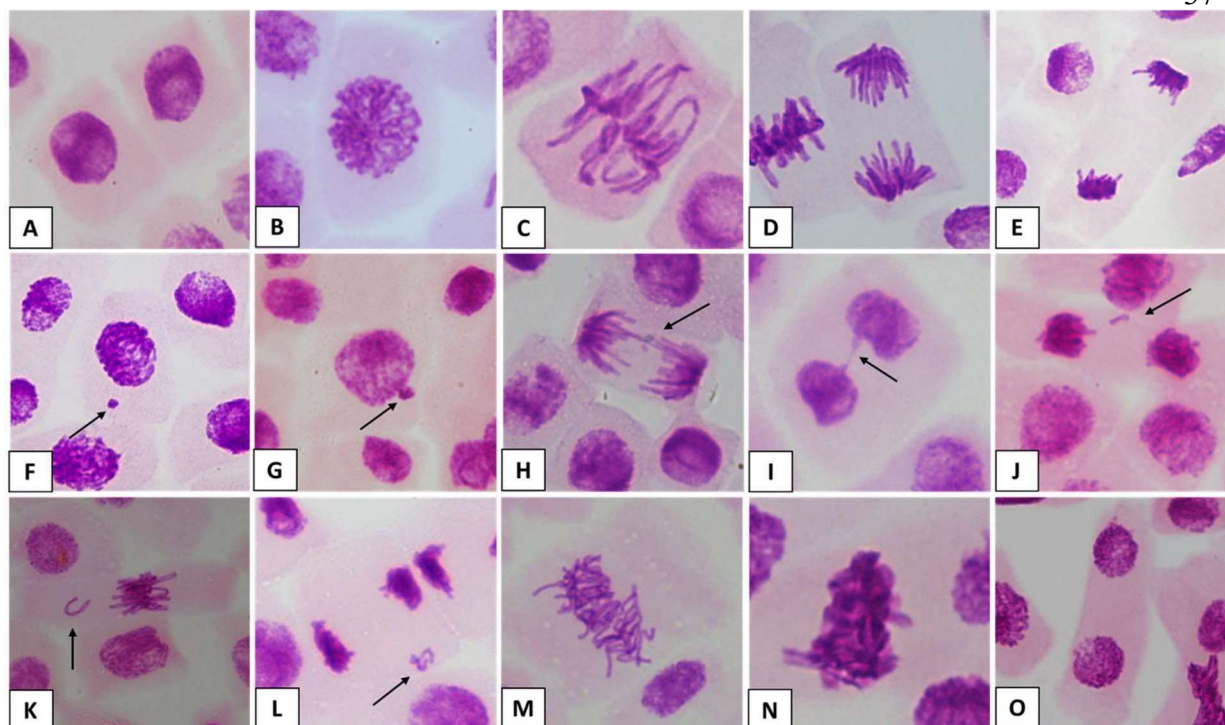


Figura 8: A – Intérfase normal; B – Prófase normal; C – Metáfase normal; D – Anáfase normal; E – Telófase normal; F – Prófase com micronúcleo; G – Intérfase com broto nuclear; H – Anáfase com ponte cromossômica; I – Telófase com pontes cromossômicas; J – Telófase com quebra cromossômica; K – Metáfase com perda cromossômica; L – Telófase com perda cromossômica; M – Metáfase poliplóide; N – Metáfase poliploide com aderência cromossômica; O – Célula binucleada.

5. DISCUSSÃO

Os cemitérios são ambientes que apresentam um alto potencial poluidor, pois são impactados por de diferentes fontes de contaminação. Entre as fontes de contaminação desses ambientes, destaca o líquido derivado da decomposição cadavérica, denominado de necrochorume (PACHECO, 2012; KEMERICH, 2012; SILVA E MALAGUTI, 2008). Nesse líquido são encontradas diferentes substâncias inorgânicas e orgânicas tóxicas, além de patógenos que podem colocar em risco a qualidade ambiental e a saúde humana (SPONGBERG e BECKS, 2000; PACHECO, 2012; KEMERICH *et al*, 2012; NECKEL *et al*, 2016; NECKEL *et al* 2017). Dentre os compostos inorgânicos do chorume destacam-se os metais e entre os orgânicos as aminas biogênicas, cadaverina e putrescina. Essas aminas, embora sejam essenciais para alguns processos fisiológicos, quando em altas concentrações, são capazes de induzir efeitos adversos em diferentes tipos celulares (ANJOS, 2013; UNAL, PALAVAN-UNSAL e TUCKEL 2008; DEL RIO, 2019). Além dos contaminantes presentes no necrochorume, os cemitérios ainda recebem impactos de outras fontes poluidoras, como de metais presentes nos adereços de urnas mortuárias, compostos usados na conservação e preparo

do cadáver para o sepultamento, pigmentos das vestimentas dos cadáveres e dos adereços das urnas e resíduos de remédios e quimioterápicos usados no tratamento do paciente falecido (PACHECO, 2012).

Nos cemitérios horizontais a percolação do necrochorume tem como primeiro destino o solo, podendo, posteriormente, atingir as águas subterrâneas. Dessa forma, os solos de cemitérios, principalmente os dos horizontais, por apresentar essa gama de contaminantes distintos, portanto de característica complexa, apresentam-se como de alto risco ocupacional, para a qualidade ambiental e para a saúde da população residente no entorno desses empreendimentos. Essa problemática apontada para os cemitérios evidencia, cada vez mais, a necessidade de estudos mais efetivos nessas áreas urbanas; de um maior monitoramento das atividades cemiteriais, bem como das condições de implantação de novos cemitérios; e, sobretudo, uma legislação mais rígida sobre a segurança dessas áreas para a saúde da população.

Apesar de diversos autores chamarem atenção para a contaminação ambiental decorrente de atividades cemiteriais, não existem dados disponíveis acerca dos efeitos ecotoxicológicos dessa contaminação. Assim, o presente estudo, por trazer informações importantes da ecotoxicidade dessas áreas urbanas, contribui para um melhor conhecimento dos perigos intrínsecos às atividades das necrópolis.

Os estudos ecotoxicológicos visam avaliar os efeitos e as influências de agentes tóxicos (sintéticos ou naturais) sobre diversos níveis de organização biológica (celular, individual, populacional, da comunidade e do ecossistema) (TRUHAUT, 1974). Apesar do interesse e necessidade de se avaliar a contaminação ambiental de forma mais holística, é impossível avaliar as consequências dos contaminantes para cada um dos organismos individualmente, uma vez que os ecossistemas são compostos por milhares de espécies. Devido a essa alta diversidade organismal, torna-se necessário escolher bioindicadores que representem o ecossistema estudado e que possam ser usados para avaliar o ambiente em questão (BURGUER, 2006; MARKET, BREURE e ZECHMEISTER, 2003).

No presente estudo foram utilizados como bioindicadores vegetais os organismos *L. sativa* e *A. cepa*, com os quais foi possível avaliar a fitotoxicidade, citogenotoxicidade e o potencial mutagênico de diferentes amostras de solo do cemitério São João Batista. O primeiro parâmetro analisado foi a porcentagem de inibição da germinação. Esse parâmetro é interessante por avaliar o primeiro momento de troca entre o bioindicador e a substância ou amostra ambiental. (SOBRERO e RONCO, 2004). Como não houve variação estatisticamente significativa no teste de germinação de *L. sativa* expostas aos solubilizados de P1, P2 e P3, em relação ao CN, pode-

se inferir que nas amostras ambientais avaliadas não apresentaram compostos de efeitos letais para esse bioindicador.

Outro teste de fitotoxicidade realizado com o bioindicador *L. sativa* foi o teste de desenvolvimento das raízes. Este teste se baseia nos índices de elongação do hipocótilo e da radícula, calculados a partir das mensurações destas estruturas, para comparar os resultados com os obtidos no CN. Esse teste é ainda mais sensível que o teste de germinação, por permitir a avaliação de efeitos sub-letais de substâncias (SOBRERO e RONCO, 2004).

Pelos ensaios de elongação dos hipocótilos, realizados no presente estudo, não foram observadas alterações estatisticamente significativas entre as raízes expostas aos solubilizados dos Pontos 1, 2 e 3 e o CN. Contudo, os resultados dos ensaios de alongamento da radícula mostraram que a amostra de solo do Ponto 2 induziu um maior crescimento médio dessa estrutura, em relação ao crescimento observado nas plantas controle. Sobrero e Ronco (2004) ressaltam que um maior desenvolvimento das raízes em relação ao CN, não deve ser interpretado como um efeito favorável ou estimulante. Os autores pontuam que alguns metais são micronutrientes e, quando em baixas concentrações, podem promover maior crescimento das raízes. Nesse sentido, outro fator que pode ser considerado nos ambientes de cemitérios é a liberação de metais pelos adereços das urnas mortuárias (SPONGBERG e BECKS, 2000; PACHECO, 2012; NECKEL *et al*, 2016; NECKEL *et al* 2017), dentre eles os micronutrientes Fe e Mn, que são considerados importantes nutrientes para a espécie *L. sativa* (YURI *et al* 2016).

Em decorrências das altas possibilidades de contaminação edáfica por atividades antrópicas, a Resolução CONAMA nº 420 de 2009 estabeleceu limites máximos para a presença de diversas substâncias nos solos, incluindo alguns metais. No entanto, esta legislação não estabelece limites máximos para as concentrações de Fe e Mg. Neste contexto, as contaminações decorrentes dos cemitérios podem estar sendo negligenciadas pela legislação, principalmente quanto aos seu potencial de poluição por metais, visto que alguns autores já identificaram níveis elevados desses elementos (tantos os previstos como os não previstos na legislação Brasileira) em ambientes de cemitérios. Spongberge Becks (2000) verificaram altos níveis de Fe, Pb, Cu e Zn em um cemitério de Ohio (EUA). Estudos realizados por Barros *et al* (2008), em um cemitério em Curitiba (Brasil), identificaram concentrações acima das recomendadas pela legislação brasileira vigente para os metais Cr e Ni. Neckel *et al*. (2016) registraram em cemitérios brasileiros concentrações de Pb e Cu acima das recomendadas pela resolução CONAMA nº 420 (2009). Assim, cabe ressaltar que existe uma alta probabilidade de

contaminação por metais nesses ambientes e que o acúmulo desses agentes no solo pode colocar em risco a qualidade ambiental e a saúde humana (DURUIBE, OGWUEGBU e EGWURUGWU, 2007). Um outro fator preocupante sobre a contaminação promovida pelas atividades cemiteriais é a extensão dessa contaminação para as águas subterrâneas. Essa contaminação repassada a esses corpos hídricos poderia afetar os padrões de potabilidade de água subterrâneas utilizadas no abastecimento público (NECKEL *et al*, 2016), bem como a viabilidade dos ecossistemas estabelecidos na área de influência dos cemitérios.

As alterações nos padrões de germinação e no crescimento de uma planta devem ser interpretadas como consequências secundárias das alterações de padrões moleculares induzidas pela substância ou amostra avaliada (FERREIRA e ÁQUILA, 2000). Nesse sentido, os aumentos significativos da elongação das radículas em P2, podem ser entendidos também como um reflexo do aumento nas taxas de divisão celular (MARCANO *et al* 2004; IQBAL *et al* 2019). Com isso, é possível inferir que esses resultados podem estar relacionados com a ação de compostos presentes no necrochorume, como a cadaverina e putrescina. Esta inferência se baseia na importância dessas aminas, quando em concentrações fisiológicas (micromolares), para os processos de divisão, crescimento e diferenciação celular, mas que, quando em concentrações superiores às fisiológicas, afetam negativamente os processos citados. As células saudáveis apresentam crescimento celular preciso e regulado, o que garante a homeostase e a arquitetura regular do tecido (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Por outro lado, um aumento significativo da divisão celular (refletido pelo maior crescimento das raízes) pode ser prejudicial, uma vez que indica crescimento celular desordenado e poderia levar à formação de tumores (HALAZS e BARATH, 2002; HOSHINA, 2002; HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

Um outro fator preocupante sobre a contaminação promovida pelas atividades cemiteriais é a extensão dessa contaminação para as águas subterrâneas. Essa contaminação repassada aos corpos hídricos poderia afetar os padrões de potabilidade de água subterrâneas utilizadas no abastecimento público (NECKEL *et al*, 2016), bem como a viabilidade dos ecossistemas estabelecidos na área de influência dos cemitérios.

A fitotoxicidade das amostras de solo coletadas no cemitério São João Batista (Leme-SP) também foi avaliada pelo bioindicador *A. cepa*. Os resultados desta análise mostraram que nenhum dos pontos avaliados exibiu alteração nas taxas de germinação das sementes, em relação ao CN. Esses dados permitiram concluir que as amostras dos pontos P1, P2 e P3 não apresentavam compostos fitotóxicos capazes de interferir na germinação das sementes desta planta, resultados estes que corroboram os ensaios de germinação com *L. sativa*.

A avaliação do potencial citotóxico dos solubilizados das amostras de solos coletados em P1, P2 e P3, foi também realizada com o bioindicador *A. cepa*. Para análise de morte celular devem ser consideradas a presença de citoplasma vacuolizado, aumento citoplasmático e deslocamento do núcleo celular para a periferia da célula. Conforme pode ser visto na tabela 5, não foram observados indícios de morte celular, indicando que as amostras testadas não apresentavam compostos cujo efeito poderia levar as células à morte.

O índice mitótico (IM) é um importante *endpoint* de citotoxicidade. A espécie *A. cepa* vem sendo muito usada para esse tipo de diagnóstico, pois apresenta alta sensibilidade às substâncias com potencial citotóxico. A avaliação desse índice pelo ensaio com *A. cepa* é feita pela contabilização de células de meristemas radiculares que se encontram nas diferentes fases do processo de divisão celular. Essa análise avalia se um determinado agente (substância, composto ou amostra ambiental) supostamente tóxico, interfere no ciclo celular. Tanto o aumento como a diminuição desse índice são respostas que indicam citotoxicidade do agente estudado (LEME e MARIN-MORALES, 2009). As análises de IM, realizadas com solubilizados das amostras de solos coletados no cemitério estudado, mostraram potencial citotóxico para todos os pontos amostrados (P1, P2 e P3), uma vez que foram observadas diminuição significativa desses índices, quando comparados com os resultados do CN (Tabela 5). De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), índices mitóticos mais baixos do que os observados no CN indicam a presença de contaminantes na amostra que atuam sobre o crescimento e o desenvolvimento do organismo teste.

Smaka-Kincl *et al* (1996) complementam que o uso do bioindicador *A. cepa* para avaliação de alterações do índice mitóticos se mostrou um parâmetro confiável para a detecção da presença de contaminantes com efeito citotóxico em uma amostra ambiental, portanto, por essa citação, é possível inferir que os contaminantes presentes nos P1, P2 e P3 apresentam efeito citotóxico para o bioindicador *A. cepa*. Essa afirmação é reforçada pelas descrições de toxicidade já registradas para os contaminantes presentes nos ambientes de cemitérios como, por exemplo, o necrochorume que contém as aminas biogênicas cadaverina e putrescina (PACHECO, 2012; ANTONIO *et al*, 2017), substâncias estas que poderiam ser as responsáveis pelo efeito citotóxico observado.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os de Unal, Palavan-Unsal e Tufekci (2008) e de Mahajan e Sharma (2008), que registraram diminuição no índice mitótico em células meristemáticas de *A. cepa* expostas isoladamente à putrescina, espermidina e espermina. Mahajan e Sharma (2008) observaram ainda que as maiores concentrações das

aminas biogênicas induziram maior inibição do índice mitótico. Pelos resultados dos estudos de Unal, Palavan-Unsal e Tufekci, 2008), os autores, concluíram que outros efeitos também avaliados, como o de genotoxicidade, podem ter sido decorrentes tanto da ação direta das aminas biogênicas, quanto da acumulação de metabólitos tóxicos.

Por toda a discussão acima, os resultados obtidos no presente trabalho chamam a atenção para o efeito citotóxico do solo avaliado, que pode ter sido induzido pela presença de cadaverina e putrescina exógenas, substâncias estas que têm, naturalmente, importante função no processo de divisão celular. Alguns autores ainda sugerem que, além das aminas biogênicas estarem presentes no necrochorume, elas podem ainda ser sintetizadas por bactérias que atuam ativamente no processo de saponificação, uma vez que já é reconhecido que os microorganismos representam uma fonte adicional exógena de cadaverina e putrescina (FIEDLER e GRAW, 2003; HALAZS e BARATH, 2002; DEL RIO *et al* 2019) Desta forma, o efeito citotóxico observado para as amostras de solo do cemitério São João Batista pode servir de alerta para os possíveis riscos que esses contaminantes passam promover no ambiente e à saúde pública. Essa preocupação pode ser ainda justificada pelas citações de Rank e Nielsen (1997) que afirmam existir uma alta correlação entre as respostas de *A. cepa* com outros bioindicadores, como ratos, e cultura de células humanas. Considerando essa correlação entre os efeitos observados no bioindicador utilizado neste estudo e as células humanas, fica clara a preocupação com a exposição ocupacional dos profissionais dos serviços funerários, que podem estar sujeitos a uma exposição contínua a esses agentes tóxicos.

A presença de metais pesados também pode ter influenciado na diminuição do índice mitótico, como foi observado por Inceer, Beyazoglu e Ergul (2000). Os autores registraram diminuição do índice mitótico em *A. cepa* exposta à solução aquosa de resíduos de uma mina de Cu. Seth e colaboradores (2008) também verificaram redução do IM de *A. cepa* exposta em soluções aquosas de Cd. Esses estudos corroboram ainda os dados de Abubacker e Sathya (2017) que verificaram diminuição dos índices mitóticos em células de *A. cepa* expostas às soluções aquosas de Cr, Cu, Pb e Zn.

Para a avaliação da genotoxicidade das amostras de solo de P1, P2 e P3 para o bioindicador *A. cepa*, foram contabilizadas as aberrações cromossômicas presentes em células das diversas fases do ciclo celular (intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase). As aberrações cromossômicas podem ser tanto estruturais como numéricas (LEME e MARIN-MORALES, 2009), As aberrações cromossômicas observadas no presente estudo foram: brotos nucleares, células binucleadas, aderências cromossômicas, pontes cromossômicas, perdas cromossômicas, quebras cromossômicas, células lobuladas, C-metáfases e células poliploides

(Figura 8). No entanto, conforme demonstrado na tabela 5, os índices de genotoxicidade dos pontos avaliados não variaram de forma estatisticamente significativa em relação ao CN, demonstrando ausência de potencial genotóxico para P1, P2 e P3.

Também foi avaliado neste estudo o potencial mutagênico das amostras dos solos (P1, P2, P3), coletadas no Cemitério de Leme-EP. O efeito mutagênico é caracterizado pela potencialidade de um agente induzir alterações na molécula de DNA, que não são corrigidas pelos processos de reparo da célula, portanto passíveis de serem transferidas para as gerações seguintes (CONNOR & FERGUSON, 1993). A avaliação do índice de mutagenicidade deste estudo, foi realizada pelo teste de *A. cepa*. Este teste é feito pela contabilização de células portadoras de micronúcleos, que são estruturas semelhantes ao núcleo principal das células, porém de menor tamanho (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

A formação de micronúcleos (MN) pode ser derivada de quebras cromossômicas, induzidas por agentes clastogênicos; de perdas de cromossomos inteiros e por eliminação de DNA amplificado em eventos de poliploidização, ambas origens geralmente associadas com a ação de agentes aneugênicos (YI e MENG, 2003; FERNANDES, MAZZEO e MARIN-MORALES, 2007; 2009; RIBEIRO, 2009). Os MN, de acordo com Hintzsche, *et al.* (2017), podem ter diversos destinos: degradação, que ocorre por ação enzimática; reincorporação ao núcleo; extrusão, derivando, por exemplo, micro células; e permanência na célula. Os MN podem se apresentar na mesma fase de divisão do núcleo principal da célula ou em fase distinta. Quando o MN acompanha a fase de divisão do núcleo da célula onde ele se encontra, ele pode se reincorporar novamente ao núcleo principal, contudo, quando não acompanha a fase nuclear, ele pode tanto permanecer na célula como ser expulso dela (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; HINTZSCHE, *et al.* 2017). Esses últimos autores ainda chamam atenção para o fato de que a eliminação de MN poderia ser um indício de apoptose.

Dentre os estudos realizados com os solubilizados das amostras dos solos do cemitério São João Batista, apenas o P1 apresentou índice de mutagenicidade estatisticamente significativo, em relação ao CN. Considerando os diversos caminhos que os MN podem seguir e que a sua presença em uma célula pode ser um indicativo de potencial mutagênico, os resultados obtidos nos ensaios com células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao solubilizado do P1, sugerem um efeito mutagênico para o solo correspondente, porém para a confirmação dessa mutagenicidade seria também interessante avaliar a presença de MN também nas células F1 das raízes desta planta. Essa análise sugerida permitiria comprovar se essas alterações foram mantidas nas células filhas. Entretanto, pelos resultados obtidos, é possível inferir que o aumento da frequência de MN, observado em P1, é um indicativo de que esse solo apresenta

substâncias com potencial mutagênico, provavelmente derivadas da contaminação complexa dos ambientes de cemitérios.

Dentre os contaminantes de solos de ambientes de cemitérios, já descrito anteriormente, devem ser considerados os metais, devido a sua alta toxicidade. Os resultados de mutagenicidade observados para o P1 podem ter diversas origens, dentre elas os metais possivelmente presentes na amostra estudada. Diferentes estudos realizados com o bioindicador *A. cepa*, por diversos autores, confirmam que a presença de metais em amostras ambientais pode induzir mutagenicidade neste organismo teste.

Steinkellner *et al.* (1998) observaram que solo contaminados com os metais As, Pb, Cd e Zn induziram eventos mutagênicos em *A. cepa*, dados estes corroborados nos estudos de contaminação de solos por metais, realizados por Souza, Costa e Vargas (2013). Nesses dois estudos, os autores observaram alterações nos índices de mutagenicidade, reforçando sobre a sensibilidade do modelo de estudo, bem como da capacidade de detectar a influência de contaminantes em misturas complexas, oferecendo assim resultados que podem ser utilizados como um sinal de alerta em estudos iniciais de áreas contaminadas.

Outros contaminantes de alta toxicidade presentes em ambientes de cemitérios, são as aminas biogênicas cadaverina e ou putrescina. Kim, Lee e Hur (2019) verificaram, pelo teste de Ames (*Salmonella typhimurium*), que existe uma correlação positiva entre a presença de aminas biogênicas em alimentos (principalmente a cadaverina) e a indução de mutagenicidade detectada pelo ensaio usado. Esses dados confirmam o potencial mutagênico das aminas biogênicas, compostos estes, como já descritos anteriormente, contaminantes comuns de necrópoles.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os solos coletados nos três diferentes locais do cemitério São João Batista da cidade de Leme-SP apresentam contaminantes tóxicos, que podem comprometer a qualidade e a estrutura biológica do solo, das águas subterrânea e, conseqüentemente, a saúde humana. Os resultados dos ensaios de mutagenicidade com *A. cepa* mostraram ainda que o solo do P1 se apresenta mais impactado pelas atividades cemiteriais que os outros pontos avaliados. Esses dados remetem à discussão de que este local é marcado por uma condição *suis generis* de inundação do cadáver, que vem mantendo o corpo em estado permanente de saponificação. Justamente foi esse local que demonstrou maior grau de contaminação, apresentando, além da ação citotóxica registrada para todas as amostras estudadas, um potencial mutagênico, que foi comprovado pelos ensaios com o bioindicador *A. cepa*. O solo coletado em P2, que apresenta condições de umidade, onde só ocorre inundação em momentos de maior pluviosidade, mas suficiente para manter e

saponificação permanente do cadáver, demonstrou potencial intermediário de contaminação, apresentando ação citotóxica em *A. cepa* e fitotóxica em *L. sativa*. Por fim, o solo de P3, que foi coletado em um local de sepultamento recente (10 dias) e que não apresenta condições de inundação ou umidade, demonstrou o menor potencial de contaminação, apresentado ação citotóxica apenas para *A. cepa*. A menor contaminação deste local pode ser decorrente da liberação dos primeiros produtos da decomposição cadavérica, visto que, como citado, o sepultamento aconteceu apenas de 10 dias antes da coleta.

Os resultados deste estudo de caso, além de chamar a atenção para a liberação, em cemitérios, de contaminantes como o necrochorume e metais derivados de implantes, urnas e tratamento do cadáver para a cerimônia de sepultamento, também demonstram uma correlação direta entre a toxicidade observada e as condições de umidade do terreno onde o corpo é sepultado. Corpos sepultados em locais extremamente úmidos, ou sujeitos a inundação, se mantêm em estado de saponificação permanente, condição esta que, além de prejudicar a finalização do processo de decomposição dos corpos e impedir uma administração adequada dos cemitérios, potencializa os efeitos e amplia o tempo da contaminação. Por todo o exposto, as atividades cemiteriais apresentam um preocupante potencial poluidor para o solo do local, com possíveis consequências à saúde ambiental e humana. Este estudo alerta ainda para a necessidade de uma urgente revisão da legislação vigente para a instalação e operação de cemitérios, bem como a instituição de monitoramento ambiental constante dos cemitérios já instalados e maiores critérios a serem adotados para novos empreendimentos deste tipo.

6. CONCLUSÃO

Os bioindicadores *L. sativa* e *A. cepa* se mostraram sensíveis para avaliar amostras ambientais complexas, como as do cemitério São João Batista da cidade de Leme-SP. Esses organismos testes foram eficientes para diferenciar as áreas de maior ou menor contaminação do cemitério, se mostrando, portanto, indicados para serem usados em avaliação ecotoxicológica desses ambientes.

Pela avaliação do índice mitótico, realizada no presente estudo, foi possível estimar a presença de contaminantes com potencial citotóxico em todas as amostras de solos coletados no cemitério São João Batista/Leme-SP;

O ponto 1 foi o que apresentou maiores níveis de toxicidade, apresentando tanto ação citotóxica com potencial mutagênico. O ponto citado é caracterizado por ser um local que possui condições severas de inundação, o que faz com que o corpo ali sepultado permaneça, a cerca de 12 anos, em estado de saponificação, fato que pode estar contribuindo para a toxicidade da

amostra estudada.

O ponto 2, apresentou condições intermediárias de toxicidade, com demonstração de ação citotóxica para *A. cepa* e fitotóxica para *L. sativa*. Este ponto também apresenta condições inadequadas para a decomposição cadavérica, mas, neste caso, o corpo sepultado, embora saponificado, só fica em contato com a água do lençol freático durante a estação chuvosa. Desta forma, é possível inferir que as condições de umidade e saponificação desse ponto influenciaram os resultados observados na avaliação realizada.

O ponto 3 foi o que apresentou a menor toxicidade, demonstrando apenas ação citotóxica para *A. cepa*. Por esses resultados é possível inferir que os ambientes mais secos são os mais indicados para o sepultamento e, conseqüentemente para a instalação de cemitérios. O resultado de toxicidade observada para deste ponto pode ser decorrente dos primeiros compostos liberados no processo de putrefação cadavérica, visto que este ponto representa um local de sepultamento.

Os solos avaliados neste estudo são misturas complexas que tem influência de diversos contaminantes. Assim, os resultados de toxicidade podem ser atribuídos, principalmente, à presença de metais pesados e compostos que constituem o necrochorume, com destaque às aminas biogênicas, cadaverina e putrescina.

Os resultados verificados nesse estudo são inéditos e apontam para uma necessidade de revisão de legislação vigente sobre a instalação e operação de cemitérios já implantados, no sentido de minimizar os riscos que esses empreendimentos possam oferecer tanto para o meio ambiente como para a saúde pública. O estudo também alerta para a urgência de se estabelecer a obrigatoriedade de monitoramento ambiental constante nos cemitérios operantes e critérios mais rígidos para a implantação de novos cemitérios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Amostragem de Resíduos Sólidos – Procedimento–10007:2004**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos – NBR 10.006**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004

ABUBACKER, M. N e SATHYA, C. Genotoxic Effect of Heavy Metals Cr, Cu, Pb and Zn Using Allium Cepa L. Biosciences Biotechnology Research Asia, v. 14, n. 3, p. 1181-1186, 2017.

AMUNO, S. A. Potential Ecological Risk of Heavy Metal Distribution in Cemetery Soils. **Water, Air, & Soil Pollution**, 224(2), p. 1-12., 2013

ANTONIO, A. S., DE PAULA, A. R. U., AGUIAR, A. T. C., DA COSTA, L. C. A., KEPPLER, R. L. F., BENTES, K. R. S., WIEDEMANN, L. S. M. Avaliação de Características Químicas

do Solo Durante a Decomposição Cadavérica e suas Aplicações à Química Forense. **Rev. Virtual Quim**, 10 (3), 574-599, 2017.

BANKS, M, K; SCHULTZ, K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, air, and soil pollution**, v. 167, n. 1, p. 211-219, 2005.

BARROS, Y. J., Melo, V. D. F., ZANELLO, S., ROMANÓ, E. N. D. L., e LUCIANO, P. R. Teores de metais pesados e caracterização mineralógica de solos do Cemitério Municipal de Santa Cândida, Curitiba (PR). **Revista Brasileira de Ciência do solo**, 32, 1763-1773, 2008.

BERANEK, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research**, v. 231, p. 11–30, 1990.

BORTOLASSI, C. C. Cemitérios: Fontes Potencialmente Poluidoras. **Universidade de passo fundo. Passo Fundo**, p. 82, 2012.

BRASIL, Lei nº 6.938. Institui a Política Nacional do Meio Ambiente, 1981

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 402, de novembro de 2008. Dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios.

CALMON, M. Considerations of coronavirus (covid-19) impact and the management of the dead in Brazil. **Forensic Science International: Repo/rts**, v. 2, p. 100110, 2020.

CHAN-KEB, C. A., PEREZ-BALAN, R. AGRAZ, M e GÓMEZ-SOLANO M. I. Acute toxicity of water and aqueous extract of soils from Champotón river in *Lactuca sativa* L. **Toxicology Reports**, v. 5, p.593-597, 2018

CONAMA. Resolução n º 7.766, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece deudiretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009

CONAMA. Resolução nº 368, de 28 de março de 2006. Altera dispositivos da Resolução no 335, de 3 de abril de 2003, que dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios. Brasília, 2007.

CONAMA. Resolução nº 335, de 3 de abril de 2003. Dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios. Brasília, 2003

CONNOR, J. A.; FERGUSON, M. A. Essential medical genetic. **Smith Blackwell Scientific Publications**, London, 1993, 260p.

COTELLE, S., MASFARAUD, J e FÉRARD, J. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p.167-171, 1999.

DE SOUZA POHREN, R., DA COSTA, T. C., e VARGAS, V. M. F. Investigation of Sensitivity of the *Allium cepa* Test as an Alert System to Evaluate the Genotoxic Potential of Soil Contaminated by Heavy Metals. **Water, Air, & Soil Pollution**, 224(3), 2013.

DEL RIO, B., REDRUELLO, B., LINARES, D. M., LADERO, V., RUAS-MADIEDO, P., FERNANDEZ, M. e ALVREZ, M. A. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Nature Scientific reports**, 9(1), 1-7, 2019.

DENT, B. B., FORBES, S. L., e STUART, B. H. Review of human decomposition processes in soil. **Environmental Geology**, 45(4), 576, 2004.

- DURUIBE, J. O., OGWUEGBU, M. O. C., e EGWURUGWU. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of physical sciences**, 2(5), 112-118, 2007.
- FERNANDES, F. C. C; MAZZEO, D. E. C; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.
- FERNANDES, T.C.C; MAZZEO D.E.C., MARIN-MORALES M.A., Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, **Pesticide Biochemistry and Physiology** 88, 252–259, 2007.
- FERRARI, J. N., PAULINO, N. C., PIOTROWISK, A. P. G., SABONARO, M. Z., e SABONARO CEMITÉRIOS HORIZONTAIS E VERTICAIS: peculiaridades, impactos ambientais e melhores práticas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 13(2), 681-688, 2015.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA M. E. A.; Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, 102: 99-112, 1985.
- FIEDLER, S.; GRAW, M. Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere. **Naturwissenschaften**, 2003.
- FORBES, S.L.; STUART, B.H.; DENT, B.B. The effect of the burial environment on adipocere formation. **Forensic Science International**, 154:24–34, 2005.
- FRANÇA, V. G. Medicina Legal. 11ª edição. Rio de Janeiro. **Editora Guanabara Koogan**, 2017.
- GÓMEZ-SAGASTI, M. T., EPELDE, L., ALKORTA, I., e GARBISU, C. Reflections on soil contamination research from a biologists2016. point of view. **Applied Soil Ecology**, 105, 207–210,
- GONÇALVES, L, R; ROBERTO, M, M; BRAGA, A, A; BAROZZI, G, B; ; CANIZELA, G, S; GIGECK, L, D; DE SOUZA, L, R; MARIN-MORALES, M, A. Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic - the environmental impact. **Environmental Science and Pollution Research**, 2021.
- GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *allium*. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, 99(3), 273–291, 1982
- GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.
- HALÁSZ, A e BARÁTH, Á.Toxicity of biogenic amines – the present knowledge. In Food Science and technology. Biogenically active amines in food, Vol VI, pp 131-141, **EC Publication**, Luxembourg, 2002.
- HANAHAN, D; WEINBERG, R, A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HINTZSCHE, H., HEMMANN, U., POTH, A., UTESCH, D., LOTT, J., e STOPPER, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 771, 85-98, 2017.
- HOSHIMA M, M, Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro - município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*, Trabalho de conclusão (Bacharel e Licenciatura - Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002, 52 p

INCEER, H.; BEYAZOGLU, O.; ERGUL, H. A. Cytogenetic effects of wastes of copper mine on root tip cells of *Allium cepa* L. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 2000.

IOAN, B. G., MANEA, C., HANGANU, B., STATESCU, L., SOLOVASTRU, L. G., e MANOILESCU, I. The chemistry decomposition in human corpses. **Rev. Chim**, 68, 1352-1356, 2017

IQBAL, M., ABBAS, M., NISAR, J., NAZIR, A., e QAMAS. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: a review. **Chemistry International**, 5(1), 1-80, 2019.

JACKSON, S. P e BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, 461(7267), 1071–1078, 2009.

JONKER, C; OLIVIER, J Mineral Contamination from Cemetery Soils: Case Study of Zandfontein Cemetery, South Africa. **J. Environ. Res. Public Health**, 9(2), 511-520, 2012.

KEMERICH, P. D. C.; BIANCHINI, D. C.; FANK, J. C.; BORBA, W. F.; WEBER, D.P.; UCKER, F. E. A questão ambiental envolvendo os cemitérios no Brasil. **REMOA**, Edição Especial LPMA/UFSM, v.13, n. 5, p. 3777-3785, 2014.

KEMERICH, P. D. C.; BORBA, W. F.; SILVA, R. F.; BARROS, G.; GERHARDT, A. E.; FLORES, C. E. B. Valores anômalos de metais pesados em solo de cemitério. **Revista Ambiente & Água**, Taubaté, Vol.7, p. 140-156, 2012.

KIM, H, S; LEE, S Y; HUR, S J. Effects of different starter cultures on the biogenic amine concentrations, mutagenicity, oxidative stress, and neuroprotective activity of fermented sausages and their relationships. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 424-429, 2019.

LADERO, V., CALLES-ENRÍQUEZ, M., FERNÁNDEZ, M., ALVAREZ, M. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, 6(2), 145-156, 2010.

LEITGIB, L; KÁLMÁN, J; GRUIZ, K. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. **Chemosphere**, v. 66, n. 3, p. 428-434, 2007.

LEME, D. M., e MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 682(1), 71–81, 2009

MAHAJAN, A; SHARMA, S. Antagonistic effect of polyamines on ABA-induced suppression of mitosis in *Allium cepa* L. **Indian journal of experimental Biology**. Vol 4 136-139, 2008

MAILA, M P.; CLOETE, T E. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n. 2, p. 107-113, 2002.

MARCANO, L., CARRUYO, I., DEL CAMPO, A. e MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleichydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, 94(2), 221-226, 2004.

MARCOMINI, LEANDRO PERES; CASTRO, ROSANIDE. Avaliação de impacto ambiental e aspectos legislativos aplicáveis em cemitérios-parque - estudo de caso do cemitério “Jardim dos lírios” - município de Bauru (SP). XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Maturidade e desafios da Engenharia de Produção: competitividade das empresas, condições de trabalho, meio ambiente. São Carlos, SP, Brasil, 12 a 15 de outubro de 2010.

Ministério da Saúde. Coronavírus Brasil. Painel Coronavírus. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em 02 de setembro de 2021.

NASCIMENTO, D. O. Cemitério do novo Coronavírus: Impactos da Covid-19 na saúde pública e coletiva dos mortos e vivos”. **Boletim de Conjuntura (BOCA)**, vol. 2, n. 4, 2020.

NECKEL, A., JUNIOR, A. C. G., BERTOLDI, T., e CHIAMENTTI, A. Contaminação de solos por metais pesados em cemitérios urbanos In SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CONSTRUÇÕES SUSTENTÁVEIS, V, 2016, Passo Fundo, **Anais** p. 1-5.

NECKEL, ALCINDO; COSTA, CARLOS; MARIO, DÉBORA NUNES; SABADIN, CLARICE ELVIRA SAGGIN; BODAH, ELIANE THAINES. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. **Rev. Bras. Gest. Urbana** [online], vol.9, n.2, pp.216-230, 2017.

OECD. Guideline for the testing of chemicals proposal for updating guideline 208; terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. 2003.

OLIVEIRA, B., QUINTEIRO, P., CAETANO, C., NADAIS, H., ARROJA, L., FERREIRA S, E., e SENOS M, M. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. **Water and Environment Journal**, 27(1), p. 99-106, 2012.

PACHECO, A. Meio Ambiente e cemitérios. São Paulo. **Editora Senac** São Paulo, 2012.

PAÍGA P., DELERUE-MATOS, C. Determination of pharmaceuticals in groundwater collected in five cemeteries' areas (Portugal). **Science of The Total Environment**, v. 569–570, p. 16-22, 2016.

PALMIERI, M. J., LUBER, J., ANDRADE-VIEIRA, L. F. e DAVIDE L. C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, v. 763, p.30-35, 2014.

RANK, J., e NIELSEN, M. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 390(1-2), 1997.

REDE, D., SANTOS, L. H. M. L. M., RAMOS, S., OLIVA-TELES, F., ANTÃO, C., SOUSA, S. R., e DELERUE-MATOS, C. Ecotoxicological impact of two soil remediation treatments in *Lactuca sativa* seeds. **Chemosphere**, 159, 193–198, 2016.

RIBEIRO, L,R; SALVADORI, D, M F; e MASQUES, E,K. A importância da Mutagênese Ambiental na carcinogênese humana, in: Ribeiro, D.M.F. Salvadori, E.K. Marques (Eds.), **Mutagênese Ambiental**, Ulbra,Canoas, pp.21-28, 2003.

RODRÍGUEZ-EUGENIO, N., MCLAUGHLIN, M. e PENNOCK, D. **Soil Pollution: a hidden reality**. Roma, FAO. 142 pp, 2018

SÃO PAULO. Resolução SS - 28, de 25-2-2013. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, Poder Executivo. Nº 56 – DOE de 26/03/13 – Seção 1 – p.33

SETH, C. S., MISRA, V., CHAUHAN, L. K. S e SINGH, R. R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology and Environmental safety**, 71(3), 711-716, 2008.

SILVA, R. e MALAGUTTI, W. Cemitérios como áreas potencialmente contaminadas. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**. 26-35, 2008.

SILVA, R. e MALAGUTTI, W. Cemitérios: fontes potenciais de contaminação. **Ciência Hoje**. 44. 24-2, 2009.

SILVA, V. T.; CRISPIM, J. De Q.; GOCH, P.; KUERTEN, S.; MORAES, A. C. Da S. De; OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, I. A.; ROCHA, J. A. Da. Um olhar sobre as necrópoles e seus

impactos ambientais. **Encontro da associação nacional de pós-graduação e pesquisa em ambiente e sociedade**, 3. 23 – 26 maio, Brasília. Comunicação Apresentada no Brasília, 2006. Vol. 1. 1 CDROM, 2006.

SISINNO, C. L. S. Disposição em aterros controlados de resíduos sólidos industriais não-inertes: avaliação dos componentes tóxicos e implicações para o ambiente e para a saúde humana. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 19(2):369-374, 2003.

SMAKA-KINCL, V., STEGNAR, P., LOVKA, M., e TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, 368(3-4), 171–179, 1996.

SOARES, A, S L; RAMOS, J; MACHADO, L P. Cemitérios em meio à pandemia: A ameaçada intensificação dos impactos ambientais. **II Semana Acadêmica de Geografia – UFF**, 2., 2020, Niterói. Anais... Niterói: 2020, pp. 19-30, 2020.

SOBRERO, M, C; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. **Instituto Mexicano de Tecnología del Agua**, México, 2004.

SPONGBERG, A. L., e BECKS, P. M. Inorganic soil contamination from cemetery leachate. **Water, air, and soil pollution**, 117(1), 313-327, 2000.

STEINKELLNER, H., MUN-SIK, K., HELMA, C., ECKER, S., MA, T. H., HORAK, O., e KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and molecular mutagenesis**, 31(2), 183-191, 1998

STORK, N.E. e SAMWAYS, M.J. Inventorying and monitoring of biodiversity, in **Global Biodiversity Assessment**(Heywood, V.H., ed.), pp. 453–543, Cambridge University Press. 1995

TRUHAUT, R. La toxicologie. Aperçus sur ses buts, ses problèmes et ses méthodes. **Sciences**, 5,35-49, 1994

TÜRKEZ, H., ARSLAN, M. E., SÖNMEZ, E., TATAR, A., AÇIKYILDIZ, M., e GEYIKOĞLU, F. Toxicogenomic responses of human alveolar epithelial cells to tungsten boride nanoparticles. **Chemico-Biological Interactions**, 273, 257–265, 2017.

U.S. Environmental Protection Agency. Using toxicity tests in ecological risk assessment, 1994.

UNAL, M., PALAVAN-UNSAL, Ne TUFEKCI, M. Effects of polyamines and polyamine biosynthetic inhibitors on mitotic activity of *Allium cepa* root tips. **Acta Biologica Hungarica**, 59(1), 93–102. doi:10.1556/abiol.59.2008.1.8, 2008.

VALERIO, M. E., GARCÍA, J. F., e PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of The Total Environment**, 378(1-2), 63–66, 2007.

WANG, Y., RODRÍGUEZde Gil, P., CHEN, Y.-H., KROMREY, J.D., KIM, E.S., PHAM, T., NGUYEN, D., ROMANO, J.L., 2017. Comparing the Performance of Approaches for Testing the Homogeneity of Variance Assumption in One-Factor ANOVA Models. **Educ. Psychol. Meas.** 77, 305–329.

WHITE, P. A., e CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 567(2-3), 227–345, 2004.

WIDYA, M.; MOFFATT, C; SIMMONS, T. The formation of early stage adipoceres in submerged remains: A preliminary experimental study. **Journal of Forensic Sciences** 57(2):328-33, 2012.

YAACOUB, S., SCHÜNEMANN, H. J., KHABSA, J., EL-HARAKEH, A., KHAMIS, A. M., e CHAMSEDDINE, F. Safe management of bodies of deceased persons with suspected or confirmed COVID-19: a rapid systematic review. **BMJ Glob Health**, 2020.

YI, H e MENG Z., Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*, **Mutation Research** 537, 109–114, 2003.

YOUNG, B. J., RIEIRA, N. I., BEILY, M. E., BRES, P. A., CRESPO, D. C., e RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 76, 182-186, 2012

YURI, J. E., MOTA, J. H., RESENDE, G. M., e SOUZA, R. J. Nutrição e adubação da cultura da alface in *Nutrição e adubação de Hortaliças*, 2016

ŻYCHOWSKI, J e BRYNDAL, T. Impact of cemeteries on groundwater contamination by bacteria and viruses – a review. **Journal of Water and Health**, 13.2, 2015