UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DAS AMINAS BIOGÊNICAS CADAVERINA E PUTRESCINA, POR MEIO DE ENSAIOS COM DIFERENTES SISTEMAS-TESTE

ANA PAULA ANDRADE BRAGA

Rio Claro - SP
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DAS AMINAS BIOGÊNICAS CADAVERINA E PUTRESCINA, POR MEIO DE ENSAIOS COM DIFERENTES SISTEMAS-TESTE

ANA PAULA ANDRADE BRAGA

Orientadora: Profª. Drª. Maria Aparecida Marin Morales

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro - SP
2023

B813a

Braga, Ana Paula Andrade
Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos das aminas biogênicas cadaverina e putrescina, por meio de ensaios com diferentes sistemas-teste / Ana Paula Andrade Braga. -- Rio Claro, 2023
157 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Citogenotoxicidade. 2. Contaminação de cemitérios. 3. Ecotoxicologia. 4. Necrochorume. 5. Bioindicadores. 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.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOGENÉTICOS DAS AMINAS BIOGÊNICAS CADAVERINA E PUTRESCINA, POR MEIO DE ENSAIOS COM DIFERENTES SISTEMAS-TESTE

AUTORA: ANA PAULA ANDRADE BRAGA
ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO (Participação Virtual)
Departamento de Fonoaudiologia / Unesp - Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília

Prof. Dr. FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA (Participação Virtual)
Centro Universitário Claretiano

Profa. Dra. VERA MARIA FERRÃO VARGAS (Participação Virtual)
Centro de Ecologia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. CASSIANA MARIA REGANHAN CONEGLIAN (Participação Virtual)
UNICAMP / Universidade Estadual de Campinas

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2023

Título alterado para: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DAS AMINAS BIOGÊNICAS CADAVERINA E PUTRESCINA, POR MEIO DE ENSAIOS COM DIFERENTES SISTEMAS-TESTE"

Dedico este trabalho à minha família,
a maior riqueza da minha vida.
Em especial, à minha mãe amada,
Francisca Braga.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por mais uma oportunidade de crescimento e evolução, por permitir que eu esteja aqui e agora. Aos meus anjos da guarda, por toda proteção, por guiarem os meus passos, ouvirem minhas preces e tocarem meu coração mostrando a direção.

Aos meus pais amados, por me concederem a vida. Aos meus irmãos queridos Kell e Du, o que seria de mim sem a presença de vocês na minha vida?! Família, vocês são minha verdadeira riqueza e minhas raízes mais profundas. Obrigada por todo amor, carinho e confiança. Amo vocês demais.

Agradeço ao meu pai Paulo Braga (*In memoriam*). Sei que de onde você estiver, estará orgulhoso de mim. Você me incentivou a chegar até aqui e eu sou muito grata por isso.

Ao meu namorado Kaíque, pelo companheirismo e amor. Obrigada pela paciência, palavras de consolo, encorajamento nos momentos mais desafiadores e, por saber cuidar tão bem de mim. Como é bom ter alguém especial ao nosso lado. Te amo, meu dengo.

À professora Marin, pela oportunidade, confiança, respeito e orientação. Sou profundamente grata por todos os ensinamentos, gentileza e paciência. Obrigada pelas sábias palavras nos momentos difíceis e por ser esta pessoa tão admirável. Te levarei para sempre no meu coração.

Agradeço à minha irmã de alma, Letícia Rosa. Faltam palavras para expressar minha gratidão durante todos esses anos de amizade. Obrigada pela sua existência, por me fazer rir em momentos que ninguém mais conseguiria, pelos papos filosóficos e por fazer parte dos capítulos mais importantes da minha vida. Tua alma cativa, girl. Amo você!

Às minhas “Girls”, também conhecidas como “as meninas dos peixes”, Ana Cris, Maraiah, Mari, Jaque e Rosa, por toda dedicação no cultivo de zebrafish e coautoria do artigo de revisão. Gratidão também pela amizade durante esta jornada, por todo auxílio durante os experimentos, pelos risos, choros e consolos. Foi um prazer inenarrável compartilhar este momento tão especial da minha vida com vocês.

Aos colegas cientistas e mutagênicos, Matheus, Franco, Bairral, Jorge, Gaby, Lê Rocha, Camila, Laís, Gigeck, Letícia Gonçalves, Adriana, Kemelly,

Giovanna, Gabriel, Nádia e Cleitinho. Obrigada por todos os ensinamentos e colaboração para a realização desta tese.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Geral e Aplicada por todo aprendizado, suporte e momentos compartilhados.

À pesquisadora Vera Lúcia S.S. de Castro, por toda colaboração, parceria, orientação e auxílio na correção do artigo desenvolvido na Embrapa Meio Ambiente.

Ao gestor e técnico do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança (Embrapa Meio Ambiente), Henrique Vallim e Rodrigo Castanha, pela paciência, conselhos e dedicação ao me orientar na parte experimental e análise dos resultados.

Ao Prof. Rodrigo Machado Pereira, por ceder o laboratório da Universidade do Vale do Sapucaí para a análise microscópica de lâminas e tornar possível a conclusão deste projeto.

À Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, ao Laboratório de Mutagênese Ambiental e Embrapa Meio Ambiente, por fornecerem toda a infraestrutura necessária para a realização deste projeto

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

***E**nfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, fica aqui meus mais sinceros agradecimentos!*

“Não temos exatamente uma vida curta, mas desperdiçamos uma grande parte dela. A vida, se bem empregada, é suficientemente longa e, nos foi dada com muita generosidade para a realização de importantes tarefas. Mas, quando desperdiçada no luxo e na negligência, se nenhuma obra é concretizada, se não se respeita nenhum valor, se não realizamos aquilo que deveríamos realizar, sentimos que a vida passou enquanto não percebíamos que passava, ela simplesmente se esvai. Desse modo, não recebemos uma vida breve, mas a tornamos.”

Sêneca – Sobre a Brevidade da Vida

RESUMO

O crescimento desenfreado da população mundial, que acontece concomitantemente com as atividades antrópicas, ocasionou sérios impactos negativos ao meio ambiente e à saúde pública. Atualmente, os cemitérios têm se destacado neste quesito, sendo considerados uma das fontes mais relevantes da poluição urbana que impacta recursos hídricos e solos. A decomposição do corpo humano é o processo mais preocupante nestes ambientes, principalmente devido a liberação do necrochorume, líquido resultante da putrefação dos corpos. As aminas biogênicas cadaverina e putrescina são substâncias que compõe o necrochorume, responsáveis pelo odor fétido da decomposição cadavérica. Ambas as substâncias apresentam potencial tóxico para diferentes organismos, incluindo seres humanos. Apesar do conhecimento sobre o risco proveniente de cemitérios, poucos estudos avaliaram a ecotoxicidade dos subprodutos oriundos da decomposição humana. Considerando o aumento constante das atividades cemiterias, bem como a lacuna de informações sobre os efeitos de seus contaminantes, fica evidente a necessidade de mais pesquisas que abordem a toxicidade do necrochorume. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as toxicidades da cadaverina e putrescina, de forma isolada e em mistura, por meio de diversos ensaios com diferentes bioindicadores aquáticos e terrestres. A espécie *Lactuca sativa* foi utilizada para avaliar a fitotoxicidade dessas aminas, pelos ensaios do índice de germinação de sementes e mensuração do eixo hipocótilo-radicular. A citogenotoxicidade e potencial mutagênico, foram avaliados pelos ensaios do índice mitótico, de indução de aberrações cromossômicas e do teste de micronúcleos, respectivamente, em células meristemáticas de *Allium cepa*. Os colêmbolos da espécie *Folsomia candida* foram empregados para avaliação da ecotoxicidade, por meio do ensaio comportamental de fuga e reprodução. A toxicidade das aminas biogênicas também foi avaliada com os bioindicadores aquáticos *Daphnia magna*, pelo parâmetro de letalidade e *Danio rerio*, por meio dos ensaios de letalidade e embriotoxicidade. Neste estudo, também foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o uso do zebrafish como modelo animal em ensaios ecotoxicológicos. Os resultados com *L. sativa* demonstraram efeito fitotóxico para a cadaverina e putrescina (diminuição do crescimento radicular e do hipocótilo), tanto de forma isolada como em mistura. Os efeitos foram mais significativos nos ensaios realizados com as associações das aminas biogênicas. Pelos ensaios realizados com *A. cepa*, foi observada maior citotoxicidade (distúrbios no ciclo celular) para as associações das aminas, do que nos testes isolados. A maior concentração avaliada (1000 mg. Kg^{-1}) foi capaz de inibir a divisão celular em mais de 80%. Pelos resultados dos testes de genotoxicidade e de potencial mutagênico, realizados com as aminas biogênicas isoladas, apenas a cadaverina foi genotóxica e potencialmente mutagênica para *A. cepa*. Por este teste, a putrescina não apresentou resultado significativo, quando comparado ao controle negativo. Contudo, as mistura das aminas potencializaram o efeito genotóxico e o potencial mutagênico desses compostos (aumento significativo de aderência cromossômica, poliploidia e broto nuclear, assim como o aumento da formação de micronúcleos). Os resultados para o teste de fuga com *F. candida* mostraram que os indivíduos tiveram preferência para o solo tratado com as aminas biogênicas, portanto não expressaram comportamento de fuga. No entanto, foram observados efeitos negativos da

cadaverina e putrescina sobre a reprodução dos colêmbolos, comprovando um efeito a longo prazo dessas aminas (diminuição do número de juvenis), principalmente para as substâncias associadas. Com relação à letalidade de *D. magna*, a cadaverina induziu maior letalidade (CL_{50} 9,5 mg. L^{-1}) que a putrescina (CL_{50} 36,7 mg. L^{-1}). Neste ensaio, não foi observado potencialização dos efeitos, para as associações das aminas biogênicas. Cadaverina também induziu maior letalidade para *D. rerio* (CL_{50} 335,5 mg. L^{-1}), em relação à putrescina (CL_{50} 452,6 mg. L^{-1}). Os resultados para embriotoxicidade foram significativos nos ensaios realizados com as misturas de cadaverina e putrescina (atraso na eclosão, malformação da coluna e edema de pericárdio). Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que as aminas cadaverina e putrescina apresentam potencialidade tóxica para diferentes organismos. O estudo realizado traz importantes informações que contribuem para melhor conhecimento da toxicidade de substâncias derivadas de processos putrefativos, comuns em ambientes de cemitérios, uma vez que existem poucos estudos realizados na área ecotoxicológica desses ambientes.

Palavras-chave: Contaminação de cemitérios, necrochorume, *Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Folsomia Candida*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*.

ABSTRACT

The unbridled growth of the world population, which occurs concomitantly with human activities, has caused serious negative impacts on the environment and public health. Currently, cemeteries have stood out in this regard, being considered one of the most relevant sources of urban pollution that impacts water and soil resources. The decomposition of the human body is the most worrying process in these environments, mainly due to the release of necro-leachate, a liquid resulting from the putrefaction of bodies. The biogenic amines cadaverine and putrescine are substances that make up the necro-leachate, responsible for the fetid odor of cadaveric decomposition. Both substances have toxic potential for different organisms, including humans. Despite knowledge about the risk from cemeteries, few studies have evaluated the ecotoxicity of by-products from human decomposition. Considering the constant increase in cemetery activities, as well as the lack of information about the effects of its contaminants, the need for more research to address necro-leachate toxicity is evident. Thus, the objective of this work was to evaluate the toxicities of cadaverine and putrescine, in isolation and in mixture, through several assays with different aquatic and terrestrial bioindicators. The *Lactuca sativa* species was used to evaluate the phytotoxicity of these amines, by testing the seed germination index and measuring the hypocotyl-root axis. Cytogenotoxicity and mutagenic potential were evaluated by mitotic index, induction of chromosomal aberrations and micronucleus test, respectively, in meristematic cells of *Allium cepa*. Springtails of the *Folsomia candida* species were used to evaluate ecotoxicity, through the avoidance and reproduction test. The toxicity of the biogenic amines was also evaluated with the aquatic bioindicators *Daphnia magna*, by the lethality parameter, and *Danio rerio*, by means of the lethality and embryotoxicity assays. In this study, a literature review was also carried out on the use of zebrafish as an animal model in ecotoxicological trials. The results with *L. sativa* showed a phytotoxic effect for cadaverine and putrescine (decreased root and hypocotyl growth), both alone and in mixtures. The effects were more significant in the tests carried out with the combinations of biogenic amines. In the tests carried out with *A. cepa*, greater cytotoxicity (disorders in the cell cycle) was observed for amine mixtures than in the isolated tests. The highest concentration evaluated (1000 mg. kg $^{-1}$) was able to inhibit cell division by more than 80%. Based on the results of the genotoxicity and mutagenic potential tests performed with the isolated biogenic amines, only cadaverine was genotoxic and potentially mutagenic for *A. cepa*. By this test, putrescine did not present a significant result when compared to the negative control. However, the mixture of amines potentiated the genotoxic effect and mutagenic potential of these compounds (significant increase in chromosomal adherence, polyploidy, and nuclear sprouting, as well as increased formation of micronuclei). The results for the flight test with *F. candida* showed that the individuals had preference for the soil treated with the biogenic amines, therefore they did not express avoidance behavior. However, negative effects of cadaverine and putrescine on the reproduction of springtails were observed, proving a long-term effect of these amines (decrease in the number of juveniles), mainly for the associated substances. Regarding *D. magna* lethality, cadaverine induced higher lethality (LC_{50} 9.5 mg. L^{-1}) than putrescine (LC_{50} 36.7 mg. L^{-1}). In this test, potentiation of effects was not observed for associations of biogenic amines. Cadaverine also induced greater lethality for *D. rerio* (LC_{50} 335.5 mg. L^{-}

^{1}) compared to putrescine (LC_{50} 452.6 mg. L^{-1}). The results for embryotoxicity were significant in the tests performed with mixtures of cadaverine and putrescine (delayed hatching, spinal malformation, and pericardial edema). From the results obtained in this study, it can be inferred that the amines cadaverine and putrescine have toxic potential for different organisms. The study carried out brings important information that contributes to a better understanding of the toxicity of substances derived from putrefactive processes, common in cemeteries environments, since there are few studies carried out in the ecotoxicological area of these environments.

Keywords: Cemetery contamination, necro-leachate, *Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Folsomia Candida*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese de cadaverina a partir da descarboxilação do aminoácido lisina pela enzima lisina descarboxilase 31

Figura 2. Biossíntese de putrescina a partir da descarboxilação do aminoácido ornitina pela ação da enzima ornitina descarboxilase 33

Artigo 1

Figura 1. Elongação do sistema radicular – hipocótilo em plântulas de *L. sativa*. A. Gráfico das diferentes concentrações testadas de cadaverina. B. Gráfico das diferentes concentrações testadas de putrescina. C. Gráfico das diferentes concentrações testadas das associações de cadaverina e putrescina. CN. Controle negativo; CP. Controle positivo; * - diferença significativa em relação ao CN ($p < 0.05$ - teste Mann-Whitney)..... 61

Figura 2. Índice Mitótico de células meristemáticas de *A. cepa*. A. Concentrações testadas de cadaverina. B. Concentrações testadas de putrescina. C. Concentrações testadas das associações de cadaverina e putrescina; CN. Controle negativo; TRIF. Trifluralina (controle positivo); MMS. Metil metanosulfonato (controle positivo); * - diferença significativa em comparação ao CN ($p< 0.05$) pelo teste Mann-Whitney 63

Figura 3. Alterações cromossômicas indicadoras de genotoxicidade (* vermelho) e de potencial mutagênico (* azul), em células meristemáticas de *A. cepa*. A. Gráfico das diferentes concentrações testadas de cadaverina. B. Gráfico das diferentes concentrações testadas de putrescina. C. Gráfico das diferentes associações de cadaverina e putrescina. * - diferença significativa em comparação ao CN ($p < 0.05$) Mann-Whitney 65

Figura 4. A-E. Células normais do ciclo celular de *A. cepa*: A. Intérfase, B. Prófase, C. Metáfase, D. Anáfase, E. Telófase; F-J. Alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à cadaverina e putrescina: F. Intérfase com broto; G. Prófase com micronúcleo; H. Metáfase com aderência cromossômica; I. Metáfase com perda cromossômica; J. Telófase com ponte cromossômica 66

Artigo 2

Figura 1. Recipientes divididos em dois compartimentos iguais. Em um dos lados foi adicionado 30 g de solo tratado e do outro, 30 g de solo controle 79

Figura 2A. Porcentagem de comportamento de fuga de colêmbolos (*F. candida*) expostos a solos contaminados com diferentes concentrações de cadaverina e putrescina. Exato de Fisher Bilateral ($p<0,05$) 81

Figura 2B. Porcentagem de comportamento de fuga de colêmbolos expostos a solos contaminados com as associações de diferentes concentrações de cadaverina e putrescina. Exato de Fisher Bilateral ($p<0,05$) 82

Figura 3A. Média de juvenis observados no teste de reprodução em colêmbolos (*Folsomia candida*) expostos por 28 dias a solos contaminados com diferentes

concentrações de cadaverina e putrescina individualmente. (*) indica redução significativa no número de juvenis, comparado ao solo controle pelo teste ANOVA/Dunnett (p< 0,05) 83

Figura 3B. Média de juvenis no teste de reprodução com colêmbolos expostos durante 28 dias em solos contaminados com diferentes associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). (*) indica redução significativa no número de juvenis, comparado ao solo controle (CN). ANOVA/Dunnett (p<0,05) 84

Artigo 3

Figure 1. A) Regression analysis for the calculation of cadaverine LC_{50}. B) Regression analysis for the LC_{50} calculation of putrescine. Statistical test determined by the “Probit Analysis” module..... 97

Figure 2. Lethality rate of zebrafish embryos exposed to cadaverine and putrescine mixture. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (LC_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett (* p<0.05) 98

Figure 1. Embryonic development at different stages of zebrafish development (24 to 96 hpf). A-D: Standard development (control) to 24, 48, 72, and 96 hpf, respectively. E-H: Developmental delay observed in zebrafish embryos exposed to the mixture of CAD and PUT at times 24 (E), 48 (F), 72 (G), and 96 hpf (H). 99

Figure 2. Hatching rate of zebrafish embryos exposed to cadaverine and putrescine mixtures. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (CL_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett (* p<0.05) 100

Figure 3. Malformations in zebrafish after 96 h of exposure to different concentrations of cadaverine and putrescine mixtures. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (CL_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett (p<0.05) 101

Figure 4. Morphological changes in zebrafish larvae after 96 h of exposure to different concentrations of cadaverine and putrescine mixtures. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (CL_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett (p<0.05). A: control (without malformations). B: pericardial edema. C: spinal malformation..... 101

Figure 5. A) Regression analysis for the calculation of cadaverine LC_{50}. B) Regression analysis for the calculation of putrescine LC_{50}. Probit Analysis ... 102

Figure 6. Lethality of *D. magna* exposed to different concentrations of cadaverine and putrescine mixtures. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (LC_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett (p<0.05) 103

Artigo 4

Figure 7. Life cycle and main stages of zebrafish development 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações (C1-C5) de cadaverina, de putrescina e das associações de ambas (CAD + PUT) utilizadas nos bioensaios realizados com *A. cepa* 43

Tabela 2. Concentrações (C1-C5) de cadaverina, de putrescina e das associações de ambas (CAD + PUT) nos bioensaios com *L. sativa* 44

Tabela 3. Concentrações expressas em mg kg^{-1} de cadaverina, putrescina e associações de ambas as substâncias utilizadas nos ensaios de fuga e reprodução com *F. candida* 46

Tabela 4. Concentrações expressas em mg. mL^{-1} da associação de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT) utilizadas nos ensaios com embriões de *D. rerio* e *D. magna* 48

Artigo 1

Tabela 1. Concentrações de cadaverina, putrescina e a associação de ambas (CAD + PUT) utilizadas nos bioensaios com *L. sativa* e *A. cepa* 56

Tabela 2. Germinação de sementes, elongação radicular e índice de germinação de *L. sativa* expostas à diferentes concentrações de cadaverina, putrescina e a associação de ambas 59

Artigo 2

Tabela 1. Concentrações (em mg kg^{-1}) de cadaverina, putrescina e das associações de ambas as aminas (CAD + PUT) utilizadas nos ensaios de fuga e reprodução realizados com *Folsomia candida* 78

Tabela 2. Valores de pH aferidos no solo contaminado artificialmente no início e no final do teste de reprodução realizado com as aminas biogênicas cadaverina (CAD), putrescina (PUT), e com a associação de ambas as substâncias (CAD + PUT)..... 83

Artigo 3

Table 1. Cadaverine (CAD) and putrescine (PUT) concentrations (LC_{50} mg. L^{-1}) used in the toxicity evaluations of mixtures of these biogenic amines for *Danio rerio* and *Daphnia magna*..... 95

Table 2. Mean lethal concentration $LC_{50\ -10}$ (mg. L^{-1}) to different concentrations of CAD and PUT after 96h. 95% confidence interval. (n = 24/concentration). Statistical test determined by the “Probit Analysis” module. 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3R’s	Replacement, Reduction e Refinement
AB	Aminas Biogênicas
AC	Alterações Cromossômicas
ANOVA	Análise de variância
B.O.D	Biochemical Oxygen Demand
CAD	Cadaverina
CL	Concentração Letal
CN	Controle Negativo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Controle Positivo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
IG	Índice de Genotoxicidade
IM	Índice Mitótico
ISO	International Organization for Standardization
L	Litros
LDC	Lisina descarboxilase
mL	Mililitros
MMS	Metilmetano Sulfonato
MN	Micronúcleo
NH_4	Íons de amônia
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
ODC	Ornitina descarboxilase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PUT	Putrescina
RNA	Ácido Ribonucleico
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization
WHC	Water Holding Capacity
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. OBJETIVOS 21
2.1 Objetivo geral 21
2.2 Objetivos específicos 21
3. REVISÃO DE LITERATURA 22
3.1 A origem dos sepultamentos 22
3.2 Legislação ambiental de cemitérios 23
3.3 Contaminação ambiental proveniente de cemitérios 24
3.4 Decomposição cadavérica 26
3.5 Necrochorume 29
3.6 Aminas biogênicas 30
3.6.1 Cadaverina 31
3.6.2 Putrescina 32
3.7 Cemitério tradicional x Cemitério ecológico 34
3.8 O uso de bioindicadores na toxicologia ambiental 35
3.8.1 *Lactuca sativa* 35
3.8.2 *Allium cepa* 36
3.8.3 *Folsomia candida* 37
3.8.4 *Danio rerio* 39
3.8.5 *Daphnia magna* 40
4. MATERIAL E MÉTODOS 42
4.1 Substâncias químicas avaliadas 42
4.2 Amostras de solo e capacidade de retenção de água (WHC) 42
4.3 Bioensaio com *Allium cepa* 42
4.3.1 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos 43
4.4 Bioensaio com *Lactuca sativa* 44
4.5 Bioensaio com *Folsomia candida* 45
4.5.1 Teste comportamental de fuga 46
4.5.2 Teste de reprodução 47
4.6 Bioensaio com *Danio rerio* 47
4.6.1 Toxicidade aguda em embriões e larvas de zebrafish 48
4.7 Bioensaio com *Daphnia magna* 49

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
Artigo 1: Cemitérios como fonte de contaminação ambiental: Fitogenotoxicidade das aminas biogênicas cadaverina e putrescina 52
Artigo 2: Avaliação do potencial ecotoxicológico de aminas biogênicas derivadas de putrefação cadavérica pelo bioindicador *Folsomia candida* 73
Artigo 3: Toxicity assessment of cadaverine and putrescine biogenic amines in aquatic organisms 90
Artigo 4: The zebrafish as an alternative animal model for ecotoxicological research and testing 110
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 146
REFERÊNCIAS 148
ANEXO I 156

1. INTRODUÇÃO

A palavra cemitério vem do grego “koimetérion”, e significa “dormitório”. Segundo as crenças cristãs, o cemitério é um local de “descanso para os mortos” e representa um local de apego emocional aos entes queridos já falecidos (BATISTA et al., 2022). Apesar da importância sociocultural desses ambientes, atualmente, os cemitérios representam importante fonte de poluição antropogênica, que acontece em escala global (LEMES et al., 2022). Segundo dados da Worldometer (2022), a população mundial é composta por 8 bilhões de pessoas e continua crescendo anualmente, população que, ao completar o ciclo de vida, precisa ser disposta em um ambiente adequado. No entanto, muitos cemitérios do mundo se encontram em locais inapropriados e sem estudos prévios dos seus possíveis impactos ambientais (CRISANTO-PERRAZO et al., 2022).

Há dois séculos, a disposição de cadáveres não era considerado um fator de poluição, visto que não havia referencial teórico sobre as condições ambientais de cemitérios (RUMBLE et al., 2014). Contudo, existe hoje uma preocupação crescente dos pesquisadores quanto à poluição gerada nesses ambientes, em decorrência, principalmente, da decomposição dos corpos ali sepultados (DENT; FORBES; STUART, 2004; GÓMEZ et al., 2022; NECKEL et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019). De acordo com Neckel et al. (2021), as atividades cemiteriais geram poluentes químicos, físicos e biológicos, que podem acarretar sérios problemas de contaminação do solo e das águas subterrâneas, sendo uma das fontes antrópicas mais preocupantes nos tempos atuais. Este cenário se agravou com a pandemia da COVID-19, devido ao alto número de óbitos decorrentes da doença e, consequentemente, dos sepultamentos realizados tanto em ambientes de cemitérios como de forma clandestina (GONÇALVES et al., 2022; KHOO et al., 2020; VAN WYK; UBOMBA-JASWA; DIPPENAAR, 2022) .

O necrochorume, líquido viscoso liberado durante o processo de decomposição cadavérica, é um dos principais responsáveis pela contaminação ambiental das necrópoles (ITODO; ENEJI; KORMI, 2021). Este lixiviado é composto por água, sais minerais e substâncias orgânicas, dentre elas, as aminas biogênicas (AB) cadaverina (CAD) e putrescina (PUT), responsáveis

pelo odor desagradável característico dos processos putrefativos (BATISTA et al., 2022; CANNING; SZMIGIN, 2010). Além disso, a liberação do necrochorume propicia a proliferação de microrganismos patogênicos de vários gêneros (NASCIMENTO, 2020; OLIVEIRA et al., 2019). As AB presentes no necrochorume são substâncias nitrogenadas, de baixo peso molecular, que são encontradas, naturalmente, em baixas concentrações nos seres vivos. Porém, quando essas AB estão em altas concentrações, elas apresentam alta toxicidade para diferentes organismos, incluindo os seres humanos (DEL RIO et al., 2020). Contudo, ainda pouco se sabe sobre a ecotoxicidade dessas AB putrefativas nos ambientes cemiteriais. Tal fato reforça a importância de se investigar, além dos riscos humanos, os riscos que essas substâncias proporcionam para os diferentes organismos que vivem no entorno dos cemitérios.

De acordo com Martinho e Lopes (2022), para se avaliar os reais efeitos de um determinado agente tóxico, é necessário realizar uma série de testes (*in vitro* e *in vivo*) desenvolvidos com diferentes bioindicadores. Essa variedade de ensaios permite monitorar tanto a extensão de uma contaminação, como avaliar a toxicidade específica de uma substância. Alguns vegetais, como as espécies *Allium cepa* e *Lactuca sativa* são excelentes bioindicadores de contaminação ambiental, sobretudo em análises de citogenotoxicidade e fitotoxicidade (GRANT, 1994; SILVEIRA et al., 2017). A simplicidade e baixo custo dessas técnicas de análises, sua rapidez na obtenção de resultados e credibilidade dos resultados obtidos fazem desses organismos plantas-modelo para estudos ecotoxicológicos, recomendadas por várias organizações internacionais (ISO, 1995; OECD, 1984; USEPA, 1996). Destaca-se ainda que, análises realizadas simultaneamente com esses dois bioindicadores vegetais permitem melhor compreensão dos mecanismos de ação das substâncias testadas.

Os impactos negativos dos cemitérios sobre o ecossistema terrestre vêm se destacando como uma preocupação de nível global, pois impedem o uso alternativo do solo local, por muito tempo. A urbanização e outras fontes antrópicas de degradação ambiental estão promovendo além da escassez de solos saudáveis, a valorização excessivas dos terrenos não contaminados (SCALENGHE; PANTANI, 2020). Esses impactos reforçam as necessidades de aplicação de baterias de ensaios ecotoxicológicos, em avaliações de riscos potenciais de contaminantes sobre os sistemas edáficos.

Os colêmbolos da espécie *Folsomia candida* são ótimos indicadores da qualidade do solo. Esses microartrópodes representam um importante elo trófico nas comunidades edáficas, além de influenciarem fortemente a ciclagem de nutrientes (JOIMEL et al., 2022). Sua diversidade e abundância nos solos, bem como a facilidade de manutenção em laboratório, justificam seu uso em estudos ecotoxicológicos. Além disso, muitos estudos demonstram a sensibilidade da espécie para diferentes poluentes. Por estas razões, os colêmbolos vem sendo considerados importantes bioindicadores a serem usados em avaliações ecotoxicológicas de sistemas terrestre (BANDEIRA et al., 2020; DE LIMA E SILVA et al., 2020; JU; ZHU; QIAO, 2019).

Os cemitérios estão entre as atividades antrópicas mais silenciosas e contínuas de contaminação de recursos hídricos. Estudos recentes, realizados em diversos países, têm mostrado que o necrochorume é um dos poluentes presentes em ecossistema aquáticos (AFANGIDEH; UDOKPOH, 2022; IDEHEN, 2020; NETTO et al., 2021; ZYCHOWSKI; BRYNDAL, 2015). Portanto, em decorrência da percolação do necrochorume em ambientes de cemitérios e do alto risco de contaminação dos corpos d'água por este poluente, é essencial que se avalie, com mais cuidado, os efeitos dos subprodutos da decomposição cadavérica sobre a biota aquática. De acordo com Rodrigues e Pacheco (2003), quando o lixiviado dos cemitérios atinge os aquíferos, suas águas se tornam veículos de contaminação e, se usadas para o abastecimento da população, resultam em consequências negativas para a saúde pública.

Dentre os bioindicadores de avaliação da qualidade da água, destacam-se os, organismos invertebrados e vertebrados de hábitos aquáticos (ANIFOWOSHE et al., 2022). A espécie *Danio rerio* (zebrafish) têm sido uma espécie de destaque em pesquisas ecotoxicológicas que avaliam diferentes poluentes. Esses organismos, além de compartilharem alto grau de homologia com humanos, apresentam inúmeras vantagens para uso em bioensaios, como ciclo de vida curto, rápida maturidade sexual, produção elevada de ovos e embriões transparentes (HOWE, 2020; LEE et al., 2022). Outro importante bioindicador de toxicidade de água doce é o microcrustáceo *Daphnia magna*. Essa espécie, também conhecida como pulga d'água, apresenta sensibilidade a contaminantes, estabilidade genética e representatividade na cadeia alimentar.

Além disso, permite a avaliação de efeitos agudos e crônicos de diversas substâncias químicas (BELAID; SBARTAI, 2021).

Considerando que os impactos ambientais causados pela produção de necrochorume em cemitérios é um tema recente e ainda pouco investigado, fica evidente a necessidade de se avaliar os efeitos ecotoxicológicos dos componentes deste resíduo. Contudo, para uma eficiente avaliação de toxicidade, é interessante que sejam realizados testes com bioindicadores pertencentes à diferentes ecossistemas e níveis tróficos. Essa abordagem traz complementaridade aos resultados, uma vez que estes organismos possuem sensibilidades diferentes ao contaminante estudado, o que possibilita estimar melhor os impactos para organismos de diferentes ambientes e níveis tróficos. Assim, a investigação do modo de ação e da toxicidade das AB presentes no necrochorume poderá trazer importantes contribuições nas tomadas de decisões dos órgãos governamentais, quanto às estratégias mais sustentáveis para a preservação ambiental e segurança à saúde humana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

As aminas biogênicas cadaverina e putrescina, liberadas durante a decomposição cadavérica, ocasionalmente podem causar contaminação e prejuízos ambientais e ser um risco para a saúde humana. O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o potencial ecotoxicológico das aminas CAD e PUT, tanto de forma isolada como associadas entre si, por meio de ensaios ecotoxicológicos realizados com diferentes bioindicadores e biomarcadores de toxicidade ambiental.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citogenotóxico e mutagênico das aminas CAD e PUT, por meio dos ensaios de índice mitótico, aberrações cromossômicas e nucleares realizados com células meristemáticas de radículas de A. *cepa*, advindas de sementes expostas à germinação em solos contaminados artificialmente com diferentes concentrações das AB ou das misturas delas;
- Avaliar o efeito fitotóxico das AB utilizando o bioindicador *L. sativa*, por meio dos testes de germinação e de inibição do alongamento do hipocótilo e radícula de plântulas, advindas de sementes expostas a solos contaminados com diferentes concentrações de CAD e PUT, de forma isolada e co-expostas.
- Avaliar a toxicidade aguda e crônica das AB, isoladas e em associação, por meio dos testes de fuga e de reprodução com o microartrópode, *F. candida* (Collembola);
- Avaliar a toxicidade aguda, pelo parâmetro de mortalidade, de diferentes concentrações de CAD e PUT, isoladas e em mistura, para o bioindicador *D. magna*;
- Investigar o potencial tóxico de CAD e PUT, isoladas e em mistura, por meio do teste de embriotoxicidade realizado com embriões de zebrafish (*D. rerio*);

- Levantar e discutir as informações obtidas na literatura científica sobre a utilização do zebrafish, como modelo animal de pesquisa científica, sobretudo nas pesquisas de avaliação ambiental.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A origem dos sepultamentos

As questões referentes à morte sempre permearam a mente da humanidade. Crenças sobre vida e morte foram moldando questões sociais, principalmente conforme as tradições religiosas e espirituais de cada civilização (OGBONNA, 2021). Sendo assim, a origem dos sepultamentos é uma temática discutida há muitos anos na comunidade científica, sobretudo no âmbito da arqueopaleontologia (WROBEL et al., 2017).

Estudos arqueológicos evidenciam que enterros e sepultamentos ocorrem desde a pré-história (KASHINA; AHOLA; MANNERMAA, 2021; RENDU et al., 2014). De acordo com Ochir-Goryaeva et al (2021), compreender os rituais fúnebres é fundamental para se reconstruir a história e elucidar questões sobre organização, hierarquia social e práticas religiosas de civilizações antigas. Embora haja diversas práticas de sepultamento, todas elas se baseiam no mesmo objetivo final, a eliminação de um cadáver (BALKAN, 2015).

Sob influência do cristianismo, o cemitério se tornou o “campo de descanso após a morte”. Enterravam-se seus entes queridos em um terreno consagrado, e como tradição, as práticas de sepultamento ocorreram, por décadas, no entorno das igrejas, próximo de áreas habitáveis (HAUSLER, 1983).

A comunidade médica do século XIX começou a se preocupar com a transmissão de doenças associadas às contaminações de locais próximos às igrejas, como epidemias de febre tifoide, febre amarela, hepatite A e peste bubônica (CECCONELLO; CENTENO; SIQUEIRA, 2019). De acordo com Cauduro; Müller e Ricardo (2019), essas doenças foram disseminadas ao longo da história, principalmente por falta de higiene e de saneamento básico e por práticas mortuárias inadequadas (MYTUM, 1989).

Devido aos riscos epidemiológicos potenciais dos cemitérios, foram decretadas mudanças, quanto ao local de sepultamento, que passaram a ser distantes da urbanização (CAUDURO; MÜLLER; RICARDO, 2019). No Brasil, a

proibição de sepultamentos em áreas urbanas foi regulamentada somente em 1828, sendo, a partir desta data, de responsabilidade dos municípios as questões sanitárias derivadas destas práticas (BORN, 2014). Contudo, a expansão desenfreada e sem planejamento da urbanização fez com que os cemitérios voltassem a se reintegrar ao perímetro urbano. Consequentemente, o seu potencial risco de contaminação física, química e microbiológica voltou a ser caracterizado como um problema mundial de saúde pública (NECKEL et al., 2021; WHO, 1998).

3.2 Legislação ambiental de cemitérios

No processo de instalação de um empreendimento, existe a necessidade de evitar ou mitigar danos ao meio ambiente (DAS; KONIETZKO; BOCKEN, 2022). No entanto, vale salientar que muitos empreendimentos foram implantados sem levar em conta os aspectos ambientais, pois não existiam, na ocasião, legislação pertinente a ser seguida (ROCHA; RIBAS; BELLO, 2013). Desta forma, muitos cemitérios brasileiros foram construídos sem contemplar medidas mitigatórias de impactos ambientais dos empreendimentos, por não existir, na época, medidas sociopolíticas que mostrassem ou trouxessem essa preocupação (SILVA et al., 2020).

Diante desta problemática e devido à precariedade de ambientes cemiteriais, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, Resolução nº 335/2003), estabeleceu normativas que dispõem sobre o licenciamento ambiental para a implantação de novas necrópoles horizontais e verticais (BRASIL, 2003). Além de estabelecer critérios para implantação de novos cemitérios, a resolução também definiu prazo para a adequação dos cemitérios instalados, no qual deveriam ser reformulados até 2010. Contudo, de acordo com a legislação vigente os cemitérios necessitam apenas apresentar um estudo simplificado de impacto ambiental. Dentre a complexidade das questões legais que envolvem os ambientes de cemitérios, está a necessidade de considerar as questões históricas, culturais e religiosas juntamente e concordante com a legislação ambiental (ROCHA; RIBAS; BELLO, 2013).

A Resolução 335/03 e suas respectivas alterações (Resoluções nº 368/06 e 402/08) determinam a exigência, quanto ao distanciamento do nível inferior da

sepultura e o lençol freático; técnicas e práticas que facilitam a troca gasosa durante o processo de putrefação; localização da área de sepultamento; caracterização do subsolo; e critérios para cemitérios instalados em áreas mananciais usados para abastecimento público (BRASIL, 2003; 2006; 2008). Contudo, muitos órgãos estaduais e municipais não possuem normas específicas e a legislação não é aplicada na maioria das vezes. Com isso, a construção de cemitérios sem informações básicas sobre aspectos geológicos, hidrológicos e pedológicos tornam o monitoramento e as ações corretivas incongruentes (BAUM et al., 2022; SILVA et al., 2020).

Esse mesmo cenário problemático observado nos cemitérios brasileiros também é identificado em vários países do mundo, apesar de muitos deles também possuírem regras para sepultamentos, quanto aos aspectos ambientais (BAUM et al., 2022; NGUYEN; NGUYEN, 2018; TURAJO et al., 2019). Portanto, os cemitérios não são regulamentados com seriedade suficiente, considerando a importância e o impacto que podem gerar à saúde ambiental. Somado a isso, a regulamentação desses ambientes se limita a gestão dos cadáveres antes da inumação ou sepultamento, ignorando os processos subsequentes, que carecem de uma análise mais detalhada, a ser realizada a longo prazo (GÓMEZ et al., 2022). Com isso, fica clara a necessidade de reformulação das políticas públicas voltadas ao gerenciamento do espaço urbano destinado aos sepultamentos.

3.3 Contaminação ambiental proveniente de cemitérios

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou, em 1998, uma revisão sobre os impactos dos cemitérios ao meio ambiente e à saúde pública, com o intuito de incentivar mais pesquisas nesta temática (WHO, 1998). Atualmente, as atividades antrópicas envolvendo o sepultamento de corpos humanos, têm sido destacadas como uma fonte significativa de contaminação ambiental. O acúmulo de cadáveres em um espaço limitado contribui para a concentração elevada de uma gama de poluentes (FRANCO et al., 2022). Além disso, como discutido anteriormente, diversos cemitérios estão instalados em locais inadequados geológica e geograficamente, sem infraestrutura necessária e sem estudos prévios sobre o impacto ambiental.

Os cemitérios promovem impactos severos ao solo e às águas subterrâneas e superficiais. O solo é um compartimento ambiental que se comporta como um filtro, seja na retenção ou dispersão de metais, de microrganismos e demais substâncias, inclusive as oriundas da decomposição cadavérica (ALCÂNTARA et al., 2010; HOSHINO, 2020). Cemitérios com solo arenoso têm maior potencial de lixiviação, ao passo que solos classificados como argilosos atuam como uma barreira física natural, portanto com mais capacidade de retenção do lixiviado (CAUDURO; MÜLLER; RICARDO, 2019; GONÇALVES et al., 2022).

Foram realizadas por, Oliveira et al. (2019) análises químicas, físicas e microbiológicas de amostras de água de recursos hídricos superficiais e subterrâneos próximos a um cemitério de Manaus/Brasil. Os autores detectaram mudanças no pH e turbidez das águas, além da ocorrência de microrganismos patogênicos. Nos estudos de Abia et al. (2019), amostras de solo de cemitério, coletadas a 2 m de profundidade, apresentaram proporções mais elevadas de bactérias patogênicas, quando comparadas com amostras de superfície. De acordo com Neckel et al. (2017), a transmissão desses agentes infecciosos pode atingir um raio superior a 400 m, além dos limites do cemitério.

O aumento exacerbado do número de mortes no mundo, durante o período da pandemia Sars COV2 de 2019, colaborou para que este cenário ficasse ainda mais preocupante (GONÇALVES et al., 2022). As consequências desta contaminação aumentada dos solos e dos recursos hídricos por necrochorume e agentes infecciosos ainda suscita dúvida e necessidade de investigação. Lins e Lins (2020), em suas discussões sobre os possíveis impactos negativos da pandemia à saúde ambiental, concluíram que os impactos mais severos estão relacionados ao lixiviado gerado pela decomposição cadavérica, seguido da possível disseminação do coronavírus. Alguns estudos apontam a possibilidade de carreamento do coronavírus pelo necrochorume (COSTA et al., 2020; FRANCO et al., 2022). Calmon (2020) traz ainda uma preocupação quanto as incertezas sobre o tempo de sobrevivência desse vírus no cadáver, após o sepultamento.

A contaminação do solo de cemitérios por metais pesados também é um fator preocupante. Os ornamentos metálicos dos caixões contribuem significativamente para o aumento da concentração de metais no ecossistema

edáfico (GONÇALVES et al., 2022; JONKER; OLIVIER, 2012). De acordo com Neckel et al. (2017), foram encontrados diferentes tipos de metais, como Cu, Zn, Fe, Mn, Pb e Cr, em amostras de solo de cemitérios. Os autores relatam que a concentração de Pb no espaço interno do cemitério foi quatro vezes maior que na área externa do mesmo, valores este que ultrapassaram os limites permitidos por lei. É importante ressaltar também que características pessoais, hábitos cotidianos e substâncias utilizadas em vida pelo indivíduo, como idade, tabagismos, drogas psicotrópicas e farmacológicas, tratamentos quimioterápicos, assim como marcapassos, restaurações dentárias, próteses, bem como substâncias usadas pós morte, como as de embalsamentos, os cosméticos entre outros, também são acrescidos aos exsudados corpóreos, durante a decomposição cadavérica, contribuindo para a poluição destes ambientes (ZYCHOWSKI; BRYNDAL, 2015).

3.4 Decomposição cadavérica

O processo de decomposição do corpo humano, que ocorrem em larga escala em ambientes de cemitérios, é um dos principais responsáveis pelo impacto ambiental desses ambientes (DENT; FORBES; STUART, 2004; IOAN et al., 2017). A decomposição cadavérica é um processo contínuo e complexo, que envolve vários estágios químicos da degradação dos tecidos moles do cadáver, até o estabelecimento da esqueletização. O tempo desta decomposição é dependente de variáveis ambientais que interferem no processo da decomposição (FORBES, 2008). Os fatores ambientais mais relevantes para o processo da decomposição são a temperatura, umidade, pH e composição do solo. No entanto, as características do corpo, como idade, massa corporal, conteúdo gástrico, estado nutricional e de hidratação, bem como a causa da morte e as vestimentas do cadáver também podem influenciar no tempo da decomposição (COCKLE; BELL, 2017). Contudo, o processo de decomposição pode ocorrer de forma distinta para cada indivíduo, mesmo que sepultados no mesmo ambiente (PINHEIRO, 2006).

Nos últimos anos, houve aumento de pesquisas, sobretudo no âmbito da ciência forense, para desenvolvimento de metodologias que possam auxiliar no conhecimento do processo de decomposição humana e estimar o intervalo pós-morte (PITTNER et al., 2020; WILLIS; TAYLERS, 2009). Embora os estágios da

decomposição cadavérica sejam subdivididos em diferentes fases, há uma divergência entre os autores em relação a nomenclatura e o número de estágios envolvidos no processo de decomposição (DENT; FORBES; STUART, 2004; GOFF, 2010; IOAN et al., 2017; VASS, 2001). Contudo, é de consenso geral que o processo se inicia quase imediatamente após a morte e finaliza, quando o cadáver é reduzido a um esqueleto (FORBES, 2008; ITODO; ENEJI; KORMI, 2021).

O corpo humano é constituído por cerca de 64% de água, 20% de proteína, 10% de lipídeos, 1% de carboidratos e 5% de minerais (DENT; FORBES; STUART, 2004; IOAN et al., 2017). Após a morte, o cadáver passa por uma série de mudanças na aparência e natureza física do corpo. O fenômeno conhecido como *Livor mortis*, é uma das primeiras alterações observáveis, que ocorre no período de 3-4 horas pós-morte, caracterizada pela descoloração (palidez) das partes superficiais do corpo. Nas primeiras 12 horas pós-morte, inicia-se a fase denominada de *Rigor mortis*, caracterizada por apresentar alterações químicas nas miofibrilas dos tecidos musculares, resultando no endurecimento dos músculos do corpo, onde normalmente permanecem rígidos de 24 a 48 h. Concomitantemente ocorre o estágio de resfriamento do corpo (18 - 20 horas pós-morte), conhecido como *Algor mortis*, no qual o corpo deixa de regular sua temperatura interna e vai se resfriando, até se aproximar da temperatura ambiente (FORBES, 2008; GOFF, 2010; JAVAN et al., 2019).

A partir do momento em que as células do corpo são privadas de oxigênio, aumenta a quantidade de dióxido de carbono no sangue, o pH diminui e os resíduos se acumulam. Simultaneamente, inicia-se o processo de autólise celular, por ação de suas enzimas, levando a ruptura dessas células (HAU et al., 2014). Este processo de autodigestão, que só é visível ao microscópio, começa, primeiramente, em tecidos com alto teor de enzima e água mas, progressivamente, afetam todos os tecidos do corpo (VASS, 2001; FORBES, 2008). A morte celular por anoxia e o consequente extravasamento das enzimas e conteúdos celulares, gera um ambiente anóxico, rico em matéria orgânica, condições ideais para o desenvolvimento de bactérias anaeróbias no trato gastrointestinal e respiratório (IOAN et al., 2017). Assim, a fermentação anaeróbicas que acontece no intestino, progride para os tecidos, formando gases como dióxido de carbono, enxofre e hidrogênio, sulfeto de hidrogênio,

metano e amônia (ONYEJIKE et al., 2022). O acúmulo desses gases no intestino vai deixando o corpo todo inflado, até ser expelido, marcando o início da próxima fase, o processo de putrefação (IOAN et al., 2017).

A putrefação consiste então em um processo natural de reciclagem, que envolve a destruição dos tecidos moles do corpo, principalmente devido à ação de microrganismos (bactérias, fungos e protozoários) e insetos decompositores. Sendo assim, a putrefação é o resultado do catabolismo dos tecidos em gases, líquidos e moléculas mais simples (ESTRIN-SERLUI; OSBORN, 2021). A pressão gerada pela formação de gases, resulta no extravasamento dos fluidos corporais através de fissuras naturais que ocorrem no corpo, causando o rompimento da camada externa da pele. Dentre os subprodutos significativos da decomposição cadavérica estão a formação de ácidos graxos, compostos fenólicos, gliceróis e aminas biogênicas (FORBES, 2008; VASS, 2001).

Pelo processo de putrefação, os tecidos e os órgãos do corpo se transformam em uma massa irreconhecível, que se liquefaz, dando continuidade ao processo de decomposição, Esse processo de liquefação é conhecido como período coliquativo (DENT; FORBES; STUART, 2004; RAO, 2022). O processo de liquefação inicia-se logo no primeiro mês da decomposição cadavérica e pode durar de 2 a 3 anos, sendo considerada uma das fases mais preocupantes em termos ambientais e de saúde pública. Este processo compreende a redução avançada dos tecidos corpóreos, que resulta na liberação do líquido viscoso, denominado necrochorume. Além disso, a quebra das proteínas em subunidades mais simples, pode propiciar o crescimento de uma gama maior de microrganismos no substrato, onde já foram encontrados vários gêneros patogênicos (FRANCO et al., 2022; KIM et al., 2015; RODRIGUES; PACHECO, 2003).

Por fim, o último dos estágios de decomposição do corpo humano é a esqueletização. Este estágio é alcançado quando todo o tecido mole do corpo foi removido permanecendo apenas os ossos, os dentes e os cabelos do cadáver. Ainda não há um período estimado como ponto final definitivo para esta fase. Neste quesito, ainda há divergências entre os autores, cujas citações variam de meses até anos. Além disso, deve-se considerar que existem também variações relacionadas a fatores intrínsecos (cadáver) e extrínsecos (ambiente) do processo de decomposição (ZHANG; PARKER, 2015).

O processo de decomposição também pode apresentar situação anômalas, como estágios de decomposição distintas entre as partes do corpo, como, por exemplo, o crânio já esqueletizado e o abdômen ainda em liquefação, o que dificulta a determinação da duração de cada estágio da decomposição (IOAN et al., 2017). Em condições favoráveis, corpos que não estão em tumbas ou caixões podem desaparecer completamente, devido aos ossos sofrerem quebra física, serem descalcificados e até mesmo dissolvidos pela ação da água e do ácido presentes no local. Ao passo que, em determinadas situações específicas de exposição ambiental, os corpos podem tornar-se fossilizados por tempo indeterminado, como ocorre por exemplo nos processos de mumificação e saponificação (ZHANG; PARKER, 2015).

3.5 Necrochorume

O necrochorume é um líquido viscoso resultante da putrefação humana, considerado o contaminante mais abundante e de maior complexidade de ambientes cemiteriais (GONÇALVES et al., 2022). Este líquido é caracterizado pela coloração castanho-acinzentada, odor fétido e elevado índice de patogenicidade (BAUM et al., 2022). O pH pode variar de 5 a 9 e sua temperatura entre 23º e 28ºC. A densidade média (1,23 g / cm^3) é maior que a da água, o que favorece a formação de plumas de contaminação. A composição do necrochorume é majoritariamente de água (60%), mas apresenta 30% de sais minerais e 10% de substâncias orgânicas, dentre elas as AB cadaverina ($C_5H_{14}N_2$) e putrescina ($C_4H_{12}N_2$) (ALCÂNTARA et al., 2010; GONÇALVES et al., 2022).

De acordo com Oliveira et al. (2019), um corpo de aproximadamente 70 kg, pode liberar de 30 a 40 litros de necrochorume. Estima-se que a liberação deste lixiviado pode ocorrer até 2,5 anos após o sepultamento, sendo mais significativo durante os primeiros 5 a 8 meses do sepultamento. O necrochorume pode carrear contaminantes químicos e microbiológicos. Dependendo das características geológicas do local, este líquido pode se infiltrar no solo e atingir águas subterrâneas. Ele pode ainda contaminar, por escoamento, águas superficiais, como rios e reservatórios, cuja contaminação pode se estender por longas distâncias e até afetar redes de distribuição de água. O necrochorume se

caracteriza hoje, como uma das principais preocupações da contaminação advindo de cemitérios (CRISANTO-PERRAZO et al., 2022).

3.6 Aminas biogênicas

As AB são compostos nitrogenados, de baixo peso molecular, cuja estrutura química contém um ou mais grupos amina (NH_2) (CHENG; SUN; CHENG, 2016). São substâncias naturalmente sintetizadas, que participam do metabolismo celular de microrganismos, plantas e animais. A liberação dessas aminas se dá por processos bioquímicos de descarboxilação de aminoácidos, intermediado por enzimas da família das descarboxilases (WÓJCIK; ŁUKASIEWICZ; PUPPEL, 2020). Os fatores que determinam a formação de AB incluem a disponibilidade de aminoácidos livres e a presença de microrganismos que atuam no processo de descarboxilação (YOON et al., 2015).

Segundo Park; Lee e Mah (2019), as AB podem ser divididas, pelo (I) número de grupamentos amina, em : monoaminas (tiramina, octopamina, dopamina, norepinefrina, histamina, triptamina, serotonina), diaminas (cadaverina e putrescina), e poliaminas (agmatina, espermina, espermidina, putrescina); (II) estrutura química: alifáticas (putrescina, cadaverina, agmatina, espermina, espermidina), aromáticas (feniletilamina, octopamina, dopamina, norepinefrina) e heterocíclicas (serotonina, histamina e triptamina).

As AB são substâncias essenciais para a manutenção da viabilidade celular, bem como para o bom funcionamento metabólico dos organismos, pois agem, principalmente, como neurotransmissores ou hormônios (WÓJCIK; ŁUKASIEWICZ; PUPPEL, 2020). Essas aminas participam de atividades como síntese de proteínas, hormônios e ácidos nucleicos; diferenciação, crescimento e proliferação celular; e manutenção da pressão arterial e temperatura corporal (JAGUEY-HERNÁNDEZ et al., 2021). Além disso, de acordo com Wójcik; Łukasiewicz e Puppel (2020), elas também podem influenciar na estabilidade da membrana, bem como na resposta ao estresse e senescência.

Em contrapartida, níveis elevados dessas AB, comumente encontrados em produtos ricos em proteínas (carnes e derivados), derivados de processos fermentativos (vinho e cerveja) e de longa maturação (queijo), revelam-se tóxicos e incluem sintomas como intoxicação alimentar, diarreia, vômitos, dores

de cabeça, sudorese ou taquicardia (DEL RIO et al., 2019; OZCELIK; TEMEL; KALE, 2020). Além disso, pela presença de nitritos, podem acelerar processos carcinogênicos devido a formação de nitrosaminas. Portanto, o alto teor de AB é considerado um marcador do nível de contaminação microbiológica dos alimentos, que causam efeitos tóxicos em humanos (CHENG; SUN; CHENG, 2016; DOEUN; SHIN; CHUNG, 2016).

3.6.1 Cadaverina

Dentre as AB derivadas do processo de decomposição cadavérica, encontra-se a diamina alifática cadaverina ($C_5H_{14}N_2$ - 1,5 Diaminopentano). Esta diamina é sintetizada por uma via exclusiva e independente em todos os organismos, frequentemente presente em todas as células (MORADI et al., 2022). A CAD é produzida pela descarboxilação do aminoácido lisina intracelular, pela ação da enzima lisina descarboxilase (LDC) (BAGNI; TASSONI, 2001; KIM et al., 2015) (Figura 1). Os sítios nucleofílicos e a natureza catiônica da CAD permitem sua interação com moléculas polianiônicas, incluindo os ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e fosfolipídios, podendo assim afetar a estabilidade dessas moléculas (KUMAR et al., 2021; MORADI et al., 2022).

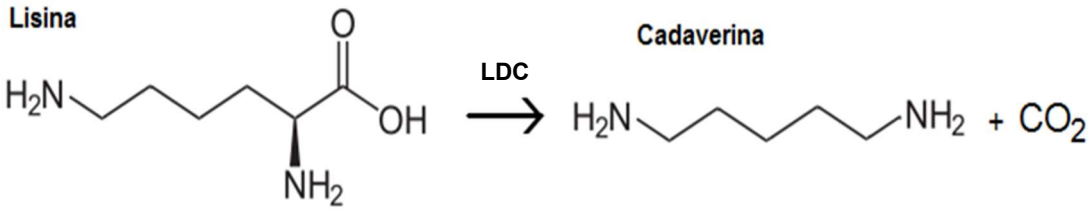


Figura 1. Biossíntese de cadaverina, a partir da descarboxilação do aminoácido lisina pela enzima lisina descarboxilase. Adaptado de Hara, 2016.

Desde o início do século passado, a CAD tem sido citada como uma substância que pode causar inflamações e até mesmo necrose em tecidos vivos (GONÇALVES et al., 2022). De acordo com Sanz-Vicente et al. (2020), a CAD é responsável pela produção de nitrosopiperidina, composto considerado carcinogênico para diferentes espécies animais. Além disso, pode ser considerada um marcador bioquímico de doenças como câncer, diabetes, artrite e fibrose cística (GONÇALVES et al., 2022; TETI; VISALLI; MCNAIR, 2002).

Outro efeito importante desta diamina é a potencialização da toxicidade de outras AB, como a histamina e tiramina (DONATO et al., 2022).

Estudos realizados por Hara (2016) indicam que diferentes concentrações de CAD foram genotóxicas para o bioindicador *A. cepa.* A autora observou indução significativa de aderências cromossômicas e formação de células binucleadas, nos ensaios realizados com células meristemáticas deste bioindicador. Também foi observado no mesmo estudo, efeito citotóxico desta diamina para diferentes linhagens celulares. Gonçalves (2022) observou, em linhagens celulares de anfíbios e de humanos, potencial citogenotóxico e mutagênico para combinações das aminas CAD e PUT.

De Souza (2021) realizou uma simulação de contaminação por necrochorume, por meio de inumação de carcaça suína em solo isento de contaminação (solo referência). Ensaios realizados com amostras de solos mostraram que houve alteração no desenvolvimento da raiz e do hipocótilo de *Lactuca sativa* portanto, foram fitotóxicos, e induziram alterações cromossômicas e nucleares em células meristemáticas de *A. cepa* (potencial citogenotóxico).

Embora os estudos envolvendo o potencial risco dos subprodutos gerados pela decomposição cadavérica ainda sejam escassos (TAVARES et al., 2020), os impactos da contaminação por componentes do necrochorume, vêm despertando cada vez mais interesse na comunidade científica. A CAD, mesmo sendo reconhecida como substância tóxica, tem sido pouco estudada, quanto ao potencial poluidor para solos e corpos d'água, como para os perigos que representa para os organismos eventualmente expostos. Até o momento, existe pouco referencial teórico que avalie a ecotoxicidade deste composto.

3.6.2 Putrescina

A poliamina alifática putrescina ($C_4H_{12}N_2$ - 1,4 Diaminobutano) também é uma das AB resultantes do processo de putrefação dos corpos. A PUT é sintetizada a partir de duas vias distintas. A mais comum é a partir do aminoácido ornitina, pela reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (ODC) (Figura 2). A ornitina, por sua vez, é produzida pela clivagem do aminoácido arginina, catalisada pela arginase (NECKEL et al., 2017). Na segunda via de

síntese da PUT, a arginina é convertida em agmatina, que pode ser convertida diretamente em PUT, pela enzima agmatinase. Segundo González-Hernández et al. (2022), a PUT desempenha processos fisiológicos imprescindíveis para manutenção celular. Ademais, esta poliamina é uma substância central na via biossintética das poliaminas mais abundantes na natureza.

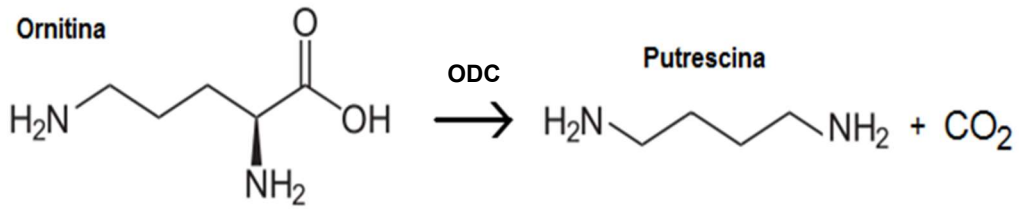


Figura 2. Biossíntese de putrescina a partir da descarboxilação do aminoácido ornitina pela ação da enzima ornitina descarboxilase. Adaptado de Hara, 2016.

Essa AB, quando em concentrações inadequadas para os organismos, tem se mostrado fortemente associada ao aparecimento de neoplasias no intestino. De acordo com Gerner e Meyskens (2004) e Gonçalves et al. (2022), existem evidências de que as AB têm um papel importante na indução de tumores malignos. A PUT pode também ser convertida em pirrolodina, que na presença de nitrito, pode formar N-nitrosopirrolidina, uma substância do grupo das nitrosaminas, reconhecidamente carcinogênica para animais e, principalmente para humanos (ABDOLLAHI, SOLGI, KARAMI-MOHAJERI, 2014). Além disso, ambas as aminas putrefativas, CAD e PUT, quando degradadas, podem gerar amônia ionizada, nitrito e nitrato que, em altas concentrações, são altamente poluentes e tóxicos para o meio ambiente e seres humanos.

Goes et al. (2021) avaliaram os efeitos de doses crescentes de putrescina injetadas em ovos sobre a eclosão dos mesmos. Os autores relataram a diminuição da eclosão dose dependente (menor eclosão/ maiores doses). O vitelo residual também foi menor nos animais que receberam PUT, quando comparados ao controle.

De acordo com Pereira (2017), células meristemáticas de *A. cepa* expostas a concentração de 23 $mg.L^{-1}$ de PUT, apresentaram aumento na frequência de micronúcleos e de aderência cromossômica, indicando ação aneugênica desta substância. Este mesmo autor relata a indução de estresse

oxidativo, citotoxicidade e genotoxicidade da PUT para células HepG2. Além disso, a amina induziu efeitos deletérios sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar machos.

Considerando a presença de PUT no ambiente e a falta de referencial teórico acerca de seu potencial tóxico, fica evidente a necessidade de mais pesquisas envolvendo a contaminação de cemitérios. Para isso, são necessários o uso de diferentes ensaios capazes de elucidar as potencialidades tóxicas destas substâncias (NECKEL et al., 2021).

3.7 Cemitério tradicional x Cemitério ecológico

As práticas funerárias atuais não diferem significativamente das que ocorriam há 50 anos atrás, quando a população mundial era a metade da atual (SCALENGHE; PANTANI, 2020). Dentre os tipos de cemitérios, destacam-se os horizontais e verticais. O cemitério horizontal é o mais comum de se encontrar no Brasil e em vários outros países do mundo. Nesta prática, os corpos são sepultados de forma subterrânea, cujos túmulos, jazigos e placas de homenagem ficam dispostos em uma área aberta. Em contrapartida, o cemitério vertical é construído em prédios com um ou mais pavimentos, onde os corpos ficam dispostos em gavetas, sem contato com o solo (ALBERTIN et al., 2013). De acordo com Mcgowan e Prangnell (2015), os cemitérios verticais podem ser a forma mais viável de mitigar os impactos ambientais desses ambientes.

A cremação é uma outra maneira de dispor cadáveres, como alternativa ao enterro, que tem sido a forma dominante de disposição corporal na Holanda (KLAASSENS; GROOTE, 2014). No entanto, os cemitérios são, além do local de enterro de cadáveres, o local onde as memórias dos mortos são sustentadas por monumentos funerários duradouros. Talvez, esta seja a principal razão das pessoas preferirem o enterro à cremação (CLAYDEN; DIXON, 2007). A cremação tem também seus problemas, do ponto de vista ambiental, pois possuem uma pegada energética alta e libera poluentes na atmosfera (ANNA; KOSIACKA-BECK, 2020). Portanto, os impactos ambientais gerados tanto pela cremação, como pelo enterro de cadáveres, são os motivos que levaram o surgimento do conceito de “eco-cemitério”, também conhecido como “enterro verde” (SCALENGHE; PANTANI, 2020; USLU; BARI; ERDOAN, 2009).

Os objetivos principais dos cemitérios ecológicos são estabelecer práticas para minimizar impactos ambientais e apresentar novas abordagens e métodos mais sustentáveis de sepultamentos. Neste contexto, discute-se sobre práticas mortuárias voltadas para a sustentabilidade ambiental e a mitigação de impactos sobre as águas subterrâneas, fauna e flora existentes na área do enterro (ANNA; KOSIACKA-BECK, 2020). Dentre as alternativas, podemos citar a utilização de materiais biodegradáveis na fabricação de caixões e a realização do tratamento químico do cadáver durante o enterro, para evitar a poluição do meio ambiente (NECKEL et al., 2017; USLU; BARI; ERDOAN, 2009). Além disso, os eco-cemitérios costumam usar sepulturas que não interferem na paisagem natural, sendo as árvores ou arbustos utilizados como marcadores nativos da paisagem. Questões de escolha do local do cemitério, formas de enterro, construção do túmulo e desenho estrutural/vegetal também são abordagens dos eco-cemitérios (MCGOWAN; PRANGNELL, 2015).

Foi realizado por Neckel et al. (2017) um estudo que buscou o modelo de cemitério ideal. Os autores consultaram, na forma de questionário, 80 pesquisadores sobre o assunto. As respostas dos entrevistados foram unânimes em sugerir cemitérios verticais como melhor opção de minimizar o potencial poluidor desses ambientes. De acordo com os relatos da pesquisa, a construção de cemitérios verticais contribui para o aproveitamento de espaço e permite o tratamento do necrochorume e gases liberados durante o processo de decomposição. Essa tipologia de cemitério é uma tendência na Europa, Estados Unidos e Japão, mas ainda limitada e preocupante no Brasil (ALBERTIN et al., 2013). Outra questão considerada no estudo de Neckel et al. (2017) é que o planejamento urbano deve levar em consideração a contaminação que os cemitérios causam nas cidades. Assim, os planejadores podem repensar em novas estratégias e manter a população informada sobre os riscos existentes de residir nas proximidades de cemitérios. Os autores ainda alertam sobre a necessidade de se encontrar formas de obrigar os cemitérios antigos a cumprirem os critérios de licenciamento ambiental pré-estabelecidos pela legislação, para que possam continuar funcionando (NECKEL et al., 2017).

3.8 O uso de bioindicadores na toxicologia ambiental

3.8.1 *Lactuca sativa*

As plantas são consideradas excelentes sistemas-teste a serem usados em monitoramento ambiental. São organismos de alta sensibilidade cujos ensaios são mais fáceis de serem realizados, quando comparados aos experimentos que utilizam animais (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Sobretudo, ainda não esbarram em questões éticas na pesquisa.

A espécie *Lactuca sativa* L. (alface) é uma dicotiledônea da família Asteraceae muito utilizadas e bem avaliadas como bioindicadora de monitoramento da ecotoxicidade de poluentes ambientais (ARAGÃO et al., 2021a). É uma espécie de planta modelo que tem se destacado em estudos de fitotoxicidade, sendo recomendada por várias agências ambientais internacionais (ISO, 1995; OECD, 1984; USEPA, 1996).

Os bioensaio com *L. sativa*, além da fácil realização já citada, permite a obtenção de resultados em curto espaço de tempo. O seu grande uso se deve à sua sensibilidade a diferentes substâncias potencialmente tóxicas, cromossomos de fácil visualização e rápida proliferação celular. Além de permitir testes macro e microscópicos simultaneamente (ARAGÃO et al., 2021a).

De acordo com Park et al. (2016), a avaliação da fitotoxicidade com este bioindicador é realizada por meio de testes macroscópicos, que avaliam a taxa de germinação de sementes e a inibição do crescimento radicular. Estes testes têm a vantagem de serem de fácil e rápida execução, bem como de baixo custo. Alterações citogenéticas também podem ser claramente observadas e avaliadas com esse bioindicador, devido ao seu baixo número cromossômico (2n = 18) e característica cariotípica favoráveis para observação microscópica (VIEIRA; MARCON; DROSTE, 2022).

3.8.2 *Allium cepa*

A espécie *A. cepa* apresenta características citogenéticas interessantes, que permitem avaliar o potencial citogenotóxico de contaminantes, por alterações das células do meristema radicular da planta. Os ensaios de toxicidade realizados com este bioindicador são de rápida execução, de baixo custo e altamente preditivos sendo, portanto, indicados para serem aplicados

em avaliação e monitoramento de toxicidade ambiental (AGUIAR; ANDRADE-VIEIRA; DE OLIVEIRA DAVID, 2016; ARAGÃO et al., 2021b).

Várias espécies de plantas são utilizadas em ensaios de toxicidade, no entanto, os bioensaio com a espécie *A. cepa* (cebola), são os mais bem estabelecidos, sobretudo na área da citogenética (PALMIERI et al., 2016). Os ensaios realizados com essa espécie permitem avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico tanto de compostos químicos como de amostras complexas, como as ambientais. Os cromossomos desta planta são grandes, em pequeno número (2n = 16) e facilmente corados, o que facilita a avaliação de danos cromossômicos e/ou distúrbios na divisão celular (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

A citotoxicidade de um poluente pode ser estimada pelos resultados obtidos nos ensaios de índice mitótico (IM), realizados com células meristemáticas de *A. cepa*. IM significativamente menores que os registrado nos testes controle negativo podem indicar que a amostra ou substância testada está interferindo nos processos de crescimento e desenvolvimento do organismo, enquanto que IM elevados indicam indução acentuada da divisão celular que, se ocorrer de forma descontrolada, pode levar a processos de tumoração (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

O ensaio de alterações cromossômicas, realizados com células meristemáticas de *A. cepa*, pode ser realizado durante todo o ciclo celular. Este ensaio pode inferir o modo de ação da substância testada (aneugênica ou clastogênica), conforme o tipo de alteração observada (GUPTA et al., 2022). Vale salientar que, os ensaios utilizados com esta espécie fornecem informações que apresentam alta correlação com outros sistemas biológicos usados para este fim, incluindo os testes com mamíferos (HARA, 2016).

3.8.3 *Folsomia candida*

As substâncias químicas provenientes de atividades antrópicas podem chegar ao solo pela liberação direta de contaminantes nestes ambientes, ou por vias indiretas, como sedimentação de poluentes atmosféricos; carreamento desses poluentes pela água de chuva; ou por emissões de efluentes em recursos hídricos, que percolam no solo. Toda essa carga de poluente que chega ao solo pode comprometer a qualidade do sistema edáfico e prejudicar todos os níveis

tróficos da biota terrestres (BHAGAT; NISHIMURA; SHIMADA, 2021). Por todas essas vias de chegada de contaminantes do solo, pode-se afirmar que a poluição química destes ambientes é contínua, o que leva a uma necessidade de avaliação constante, tanto dos níveis de contaminação como do potencial de risco desses ambientes, para que se possa evitar o comprometimento da cadeia trófica do solo (LAVADO et al., 2022).

A utilização de diferentes invertebrados de ambientes edáficos como indicadores da qualidade ou toxicidade do solo é uma estratégia interessante para investigar os efeitos ecotoxicológicos de poluentes desses ambientes (BAKKER et al., 2022). Os testes recomendados e padronizados para este fim, incluem organismos como: minhocas (*Eisenia andrei e E. fetida*), colêmbolos (*Folsomia candida e F. fimetaria*), enquitreídeos (*Enchytraeus albidus* e *E. crypticus*), ácaros (*Hypoaspis aculeifer*) e isópodos (*Porcellio scaber* e *Porcellionides pruinosis*). Estes organismos são reconhecidos pela sensibilidade de detectar alterações antrópicas em ecossistema terrestre (KONESTABO et al., 2022).

Dentre os organismos citados, destacam-se o pequeno artrópode pertencente a classe Collembola, da espécie *F. candida*. Os colêmbolos se tornaram uma espécie modelo em ensaios ecotoxicológicos desde 1960 (VAN GESTEL, 2012). Esses organismos compreendem um grupo de microartrópodes da mesofauna do solo, muito comum e difundido em solos de todo o mundo (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005). São organismos que atuam, principalmente, na decomposição da matéria orgânica, sendo, portanto, fundamentais na ciclagem de nutrientes e fertilidade desses ambientes (LAVADO et al., 2022). Seu curto ciclo de vida, fácil manutenção em laboratório e a capacidade de reprodução partenogenética faz com que esses organismos sejam excelentes bioindicadores para estudar parâmetros individuais e populacionais de impacto ambiental, em um único experimento (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005). Essa espécie teve seu genoma sequenciado, o que facilitou o desenvolvimento de ferramentas moleculares para estudar as respostas genômicas à poluição (BAKKER et al., 2022).

Folsomia candida é uma das espécies mais utilizadas para avaliação de risco ambiental, principalmente devido à padronização dos testes de comportamento de fuga (ISO 17512-2) e de reprodução (ISO 11267). Além disso,

os colêmbolos respondem a uma variedade de fatores ambientais e ecológicos (NATAL-DA-LUZ et al., 2012). O comportamento de fuga é um teste cada vez mais frequente na avaliação da ecotoxicologia terrestre. Além dos resultados em curto período, o ensaio indica a existência de condições desfavoráveis do ambiente (ZORTÉA et al., 2016). De acordo com Tina (2021), quando um organismo é exposto a um determinado contaminante, um dos primeiros mecanismos de defesa é a fuga. Portanto, a evitação de solos contaminados é um comportamento natural de organismos de hábito terrestre, devido à relação existente entre a biodisponibilidade dos poluentes e a qualidade do solo (OLIVEIRA, 2021). Em contrapartida, a avaliação da toxicidade crônica (teste de reprodução por 28 dias) tem por objetivo avaliar os efeitos de uma determinada substância, sobre a quantidade de juvenis gerados, a partir da exposição de indivíduos adultos (JU; ZHU; QIAO, 2019).

3.8.4 *Danio rerio*

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo tropical, pertencente à família Cyprinidae. A espécie foi introduzida como modelo animal em estudos genéticos no início dos anos 80 e emergiu rapidamente como modelo chave na toxicologia aquática (FITZGERALD et al., 2021; WALKER; STREISINGER, 1983). O zebrafish tem sido muito utilizado em ensaios ecotoxicológicos, para elucidar efeitos de contaminantes, uma vez que a espécie reage com grande sensibilidade às mudanças ambientais (CAMPOS-SÁNCHEZ; ESTEBAN, 2021). Além disso, são usados como modelo para o estudo de diferenças doenças humanas, devido ao alto grau de similaridade genética com humanos (GARCÍA-MORENO et al., 2019).

O modelo experimental zebrafish possui diversas vantagens sobre o modelo com roedores, incluindo o baixo custo para manutenção, alta taxa de fecundidade (aproximadamente 200 ovos por acasalamento), rápido desenvolvimento embrionário (cérebro, coração, fígado, pâncreas, rins, ossos, músculos e sistemas sensoriais funcionando, 5 dias após a fertilização) corpo transparente e clareza óptica do embrião, assim como tamanho pequeno, que permite fácil manuseio de espécimes no laboratório (CHOI et al., 2021; KIMMEL et al., 1995). Tal fato aumenta o potencial de entendimento dos efeitos de poluentes ambientais sobre o comportamento de populações aquáticas, além de

incorporar o princípio dos 3R's na experimentação animal, incluindo o potencial de redução, refinamento e substituição (PARKER, 2016).

O teste de toxicidade aguda em embriões de peixes (FET) foi desenvolvido como uma alternativa ao teste de toxicidade aguda realizada com peixes adultos/juvenis. Esses testes são importantes para a avaliação do comprometimento de poluentes sobre as fases de crescimento, reprodução e sobrevivência dos organismos aquáticos (BOWLEY et al., 2022). De acordo com Zhou et al. (2018), muitos contaminantes podem afetar o desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish. Com isso, o teste FET destina-se a determinar a toxicidade aguda de substâncias químicas sobre os estágios embrionários de peixes (OECD 236, 2013). A duração de 96 horas do ensaio permite a avaliação de parâmetros como mortalidade, formação de edemas, frequência cardíaca, taxa de eclosão, absorção do saco vitelínico, locomoção e natação (VALLIM et al., 2022).

3.8.5 *Daphnia magna*

Para os testes de ecossistemas aquáticos e terrestres, é importante que os bioindicadores selecionadas sejam espécies-chave para o nível trófico que está sendo avaliado (LOVERN; KLAPER, 2006). Os crustáceos de água doce, *Daphnia magna e Ceriodaphnia dúbia*, são organismos filtradores com capacidade de absorver e ingerir pequenas partículas suspensas na água. Aljaibachi e Callaghan (2018) relatam que estes organismos podem filtrar até 400 mL de água por dia, por isso, têm maior potencial de serem afetados pela ingestão de partículas tóxicas presentes na água, em comparação com outros organismos.

A espécie *D. magna*, conhecida como pulga d'água, é membro importante do zooplâncton de lagos e ocupa uma posição crítica na cadeia alimentar, pois servem de alimento para peixes juvenis (TKACZYK et al., 2021). Além disso, são consumidores primários que se alimentam basicamente de algas, embora também sejam capazes de consumir bactérias, rotíferos e náuplios e copépodes. Partículas de 1-70 µm de tamanho também são facilmente ingeridas (SHAFIEE et al., 2021).

D. magna é amplamente utilizada em estudos ecotoxicológicos por várias organizações ambientais, incluindo a Agência de Proteção Ambiental dos EUA

(USEPA) (LOVERN; KLAPER, 2006). Isso se deve, principalmente, a sua sensibilidade a estressores externos, reprodução rápida, natureza reprodutiva partenogenética e facilidade de serem mantidas em laboratório (XU et al., 2020). As partículas de poluentes ingeridas por estes organismos podem interferir na fisiologia, capacidade de alimentação, crescimento, reprodução e/ou sobrevivência dos espécimes (ALJAIBACHI; CALLAGHAN, 2018). Portanto, *D. magna* possui uma conexão vital na cadeia alimentar, ficando entre as algas que consomem e os peixes de importância ecológica e econômica que os consomem. Com isso, torna-se imprescindível compreender a resposta tóxica destes organismos, aos poluentes ambientais (LOVERN; KLAPER, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias químicas avaliadas

Para o desenvolvimento dos bioensaios foram utilizadas as substâncias químicas sintéticas cadaverina (1,5-Diaminopentano, fórmula molecular $C_5H_{14}N_2$, peso molecular 102,18 g/mol, pureza de 97%, CAS nº. 462-94-2, Sigma-Aldrich) e putrescina (1,5-Diaminobutano, fórmula molecular $C_4H_{12}N_2$, peso molecular 88,15 g/mol, pureza de 99% CAS nº. 110-60- 1, Sigma-Aldrich). Todos os experimentos foram conduzidos com diferentes concentrações das AB CAD e PUT, testadas de forma individual ou associadas entre si (CAD + PUT).

4.2 Amostras de solo e capacidade de retenção de água (WHC)

As amostras de solo (latossolo) utilizadas como substrato para os experimentos com os bioindicadores *A. cepa*, *L. sativa* e *F. candida* foram coletadas no Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista.

Para o cálculo da capacidade máxima de retenção de água no solo (Water Holding Capacity – WHC), cadinhos de 25 mL foram preenchidos com solo e submersos em um recipiente com água, por um período de 2 h. Em seguida, para drenar a água, os cadinho foram colocados sobre um recipiente, por mais 2 h. Posteriormente, os cadinhos foram colocados em estufa à 105 ºC, até obter massa constante. A capacidade de retenção de água do solo foi então calculada através da porcentagem de massa seca. Para os testes realizados com as espécies *A. cepa* e *L. sativa* foram estabelecidos WHC (70%), já para a espécie *F. candida* o WHC estabelecido foi de 45%.

4.3 Bioensaio com *Allium cepa*

Para avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico de CAD e PUT, cem sementes de *A. cepa* (variedade Baia Periforme -marca Isla®) foram submetidas à germinação em placas de Petri, contendo 30 g de solo contaminados artificialmente, de acordo com as concentrações descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações (C1- C5) de cadaverina, de putrescina e das associações de ambas (CAD + PUT) utilizadas nos bioensaios realizados com *A. cepa*.

Concentrações (mg/kg) de solo					
[ ]	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**
Cadaverina	200	400	600	800	1000
Putrescina	200	400	600	800	1000
CAD + PUT	600 + 200	600 + 1000	1000 + 200	1000 + 1000	-

Os bioensaios foram realizados em triplicata e de forma inteiramente casualizada. Para o controle negativo (CN), o solo foi umedecido com água destilada e para os controles positivos (CP) com uma solução aquosa de Metilmetano sulfonato (MMS – 10 mg/L) e de Trifluralina (0,84 mg/L). Posteriormente, as placas foram incubadas em B.O.D por 5 dias, a temperatura controlada (22ºC ± 2ºC), com fotoperíodo de 12h.

Após o período de germinação, as radículas com aproximadamente 2 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético glacial, 3:1, v/v), por um período de 6 h, em temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a troca do fixador por um recém-preparado, onde as sementes germinadas foram armazenadas a 4 ºC, até sua utilização na confecção de lâminas.

4.3.1 Testes de Aberrações Cromossômicas e de Micronúcleos

A realização das análises citogenéticas, pelos ensaios de Aberrações Cromossômicas (AC) e de Micronúcleos (MN), foram feitas de acordo com o protocolo de Grant (1982), com algumas modificações. Primeiramente, as raízes foram passadas por três banhos de 3 minutos em água destilada. Em seguida, as raízes foram submetidas à uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60 ºC, durante 10 minutos, e lavadas em água destilada. Posteriormente, as raízes foram submetidas em reativo de Schiff, por duas horas, e após esse período, foram lavadas em banhos consecutivos de água destilada até a retirada do excesso de Schiff. Em seguida, as raízes foram dispostas em lâminas, e os meristemas radiculares foram seccionados em uma gota de carmim acético (2%). Os meristemas foram recobertos com lamínula e suavemente esmagados. Por fim,

as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para posterior observação em microscópio.

O efeito citotóxico das substâncias-teste foi avaliado pelo teste do índice mitótico (IM), cuja porcentagem de divisão foi calculada pela razão entre o número de células em divisão e o número total de células avaliadas. A genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de AC (perda, ponte, broto, aderência cromossômica, C-metáfase, entre outros) e anormalidades nucleares (núcleo lobulado e poliploide). Já para o potencial mutagênico, foram consideradas as quebras cromossômicas e os micronúcleos. As análises das lâminas foram realizadas em microscópio de luz. Foram contadas 12 lâminas/tratamento, 500 células por lâmina, totalizando 6.000 células/tratamento. Os resultados das diferentes concentrações foram comparados com os dados do controle negativo, e a análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney ($p<0,05$).

4.4 Bioensaio com *Lactuca sativa*

Os bioensaios com a espécie *L. sativa* (variedade Grand rapids – Isla®) foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Sobrero e Ronco (2004). Para este ensaio, 20 sementes de *L. sativa* foram submetidas à germinação em placas de Petri, contendo 30 g de solo contaminados artificialmente, de acordo com as concentrações apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações (C1- C5) de cadaverina, de putrescina e das associações de ambas (CAD + PUT) utilizadas nos bioensaios com *L. sativa*.

Concentrações (mg/kg) de solo					
[ ]	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**
Cadaverina	200	400	600	800	1000
Putrescina	600	700	800	900	1000
CAD + PUT	400 + 400	400 + 1000	1000 + 400	1000 + 1000	-

Os bioensaios foram realizados em triplicata de forma inteiramente casualizada. As placas foram incubadas em B.O.D por 120 h, a temperatura de 22 ºC ± 2 ºC, sem fotoperíodo. O CN foi realizado com água destilada e o CP

com sulfato de zinco heptahidratado (0,05M). Após o período de incubação, foram contabilizadas as sementes germinadas, para obtenção da porcentagem e índice de germinação (IG) (GONÇALVES et al., 2020; TIQUIA; TAM; HODGKISS, 1996).

O comprimento das radículas e dos hipocótilos das sementes germinadas, foram aferidos com o auxílio de um paquímetro digital e comparadas, estatisticamente, com os dos controles, para análise de crescimento inicial de plantas. Para a análise de significância das diferenças registradas para a germinação, o comprimento da radícula e do hipocótilo, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p<0,05$).

4.5 Bioensaio com *Folsomia candida*

Os exemplares de *F. candida,* utilizados nos ensaios de toxicidade do solo, foram obtidos de culturas sincronizadas, já estabelecidas no Laboratório de Mutagênese Ambiental – Unesp. Os indivíduos foram mantidos em potes de plástico, com pequenas perfurações na superfície para permitir a troca gasosa. O substrato de criação consiste em uma mistura homogênea de gesso e carvão ativado (proporção de 10:1, respectivamente). Os organismos foram dispostos em B.O.D à 20 ± 2ºC, com fotoperíodo de 12 h e alimentados com fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), duas vezes por semana. Gotas de água destilada também foram adicionadas nos potes semanalmente, para manter o teor de umidade. Além disso, foi induzida a reprodução dos colêmbolos. A coleta de ovos foi realizada, semanalmente, com o objetivo de manter as culturas sincronizadas.

A contaminação do solo foi realizada, artificialmente, com soluções aquosas das AB, cujo volume foi calculado para atingir 45% da capacidade de campo do solo (WHC), como descrito no item 4.2. As concentrações definitivas foram estabelecidas de acordo com os resultados preliminares de mortalidade (0; 1; 10; 100 e 1000 mg/kg solo). Na tabela 3 estão apresentadas as concentrações definitivas de CAD e PUT (isoladas e em conjunto) para o teste de fuga e reprodução.

Tabela 3. Concentrações expressas em mg kg^{-1} de cadaverina, putrescina e associações de ambas as substâncias utilizadas nos ensaios de fuga e reprodução com *F. candida*

Concentrações (mg/kg) de solo					
[ ]	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**
Cadaverina	200	400	600	800	1000
Putrescina	600	700	800	900	1000
CAD + PUT	200 + 600	600 + 1000	1000 + 200	1000 + 1000	-

4.5.1 Teste comportamental de fuga

Os ensaios ecotoxicológicos de toxicidade aguda (comportamento de fuga) foram conduzidos de acordo com as normas ISO 17512-2 (2011), com delineamento inteiramente casualizado, e em quintuplicata. Para a montagem do experimento, foi utilizado potes plásticos circulares (10 cm de diâmetro e 6 cm de altura), divididos ao meio com o auxílio de uma divisória inserida verticalmente, onde cada um dos lados recebeu 30 g de solo. Um dos lados do recipiente foi preenchido com solo controle (CN), e o outro com solo tratado de acordo com as respectivas concentrações testadas. Para o tratamento controle, as duas seções do recipiente foram preenchidas com solo natural, sem adição das substâncias-teste. A divisória plástica foi então retirada e 20 indivíduos entre 10 e 12 dias foram colocados sobre a linha de separação formada. O teste teve duração de 48 h e os organismos não foram alimentados durante este período. Após as 48 h, a divisória foi novamente inserida, verticalmente, no meio do recipiente, dividindo-o em duas seções (solo tratado e não tratado), onde cada porção foi transferida cuidadosamente para outro recipiente. Em seguida, foi adicionado água e algumas gotas de corante azul para a contabilização dos indivíduos flutuantes e sobreviventes, encontrados em cada um dos compartimentos.

O número de indivíduos no teste comportamental de fuga foi analisado pelo teste do Exato de Fischer (bilateral) - *Fischer Exact Test (two-tailed)*, o qual compara o comportamento observado, em relação ao comportamento esperado, ou seja, a ausência de fuga. Os valores foram expressos graficamente em porcentagem de fuga.

4.5.2 Teste de reprodução

Os ensaios de reprodução com *F. candida* foram realizados de acordo com os procedimentos descritos pela ISO 11267 (1999). Para a montagem do experimento, foram utilizados recipientes cilíndricos de vidro (4 cm de diâmetro e 7 cm de altura). O ensaio foi conduzido em quintuplicata, onde cada réplica recebeu 30 g de solo contaminado com as diferentes concentrações de CAD e PUT avaliadas no presente estudo (Tabela 3).

Para cada unidade experimental, foram inseridos 10 colêmbolos com idade entre 10 e 12 dias, e 2 mg de fermento biológico (fonte de alimento). Os recipientes foram abertos, semanalmente, para a correção da umidade e troca gasosa. Após 14 dias do início do experimento, os indivíduos foram alimentados novamente. Os experimentos tiveram duração de 28 dias, e ao final deste período, cada réplica de solo foi transferida para outro pote, sendo, em seguida submerso em água, para favorecer a flutuação dos indivíduos. Para melhor visualização, foram adicionadas gotas de corante azul. Por fim, as réplicas foram fotografadas e os indivíduos contabilizados, por meio das imagens digitais, utilizando o software ImageJ.

A normalidade e homogeneidade de variância dos dados foram avaliados pelos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Em seguida, foi realizado o teste paramétrico ANOVA (*Analysis of Variance*), seguido do pós-teste de Dunnet ($p<0,05$).

4.6 Bioensaio com *Danio rerio*

Os testes com o organismo-modelo zebrafish foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa – Meio Ambiente. Os procedimentos utilizados foram aprovados, previamente, pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme apresentado no Anexo I.

Os exemplares adultos (machos e fêmeas) de *D. rerio* foram mantidos em condições de laboratório, no sistema de recirculação Rack Hydrus (Alesco®). A água utilizada no sistema foi obtida por osmose reversa, passando por vários níveis de filtração, esterilizada por luz ultravioleta (UV) e com ajuste automático de pH (7,0 ± 0,2) e condutividade (400 ± 0,2 µS). A temperatura da água foi mantida a 28 ºC ± 0,2 e oxigênio dissolvido em 8 ppm. Os peixes foram mantidos

com fotoperíodo de 14:12 h (claro/escuro) e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (TetraMin), e uma vez ao dia com náuplios de *Artemia salina*.

Para determinar a faixa de concentração letal média (CL_{50}) dos organismos, foram realizados testes preliminares com diferentes concentrações das AB (0; 0,1; 1; 10 e 100 mg. L^{-1} – dados não apresentados). As concentrações isoladas e definitivas de CAD e PUT, utilizadas para os ensaios com embriões de zebrafish foram as seguintes: 200; 400; 600; 800 e 1000 mg. mL^{-1}. Já as concentrações das mistura de CAD e PUT, estão apresentadas na tabela 4. Para todos os bioensaios com *D. rerio*, foram incluímos o CN (somente meio para embrião), e o CP, realizado com exposição a 4 mg. mL^{-1} de dicloroanilina.

Tabela 4. Concentrações expressas em mg. mL^{-1} da associação de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT) utilizadas nos ensaios com embriões de *D. rerio* e *D. magna*.

Identificação	Concentrações mg. L^{-1}		
	CAD		**PUT**
C1	1/10 CL_{50}	+	1/10 CL_{50}
C2	CL_{50}	+	1/10 CL_{50}
C3	1/10 CL_{50}	+	CL_{50}
C4	CL_{50}	+	CL_{50}

4.6.1 Toxicidade aguda em embriões e larvas de zebrafish (FET)

Um dia antes da realização dos ensaios, foram selecionados os peixes na proporção de 2:1 (machos-fêmeas) e transferidos para aquários de reprodução. A desova iniciou-se durante as primeiras horas do ciclo claro da manhã seguinte. Ovos coletados cerca de 30 min após a desova foram transferidos para uma placa de Petri, contendo apenas o meio de cultivo para embrião. Com auxílio de um estereomicroscópio, foram separados os ovos viáveis (fertilizados) dos não-viáveis (coagulados), os quais foram descartados.

Os testes de toxicidade aguda com embriões de zebrafish foram conduzidos de acordo com a OECD 236 (2013). Para cada unidade experimental, vinte e quatro embriões (3 horas pós-fertilização – hpf) foram distribuídos, individualmente, em placas de 24 poços, contendo 2 mL de solução

teste por poço. As placas foram mantidas em incubadora B.O.D a 26 ± 0,2 ºC, e os embriões de *D. rerio* foram expostos às substâncias-teste por 96 h, de acordo com as concentrações apresentadas na tabela 4. Os efeitos das substâncias foram fotografados a cada 24 h, em estereomicroscópio, para a avaliação dos parâmetros de mortalidade, taxa de eclosão e malformações durante o desenvolvimento embrionário.

Para a análise estatística dos resultados da determinação da CL_{50} foi utilizado o método de "Probit Analysis". Já os dados obtidos com as AB em mistura, foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA, seguido do pós-teste Dunnet ($p<0,05$).

4.7 Bioensaio com *Daphnia magna*

Os testes de toxicidade aguda com a espécie *D. magna* foram desenvolvidos no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente. Os indivíduos foram cultivados em aquários de dimensões iguais (40 x 25 x 15 cm), preenchidos com água reconstituída (meio M4), seguindo as recomendações técnicas da ABNT NBR 12.713/2016. A manutenção do cultivo foi realizada duas vezes por semana, com troca da água reconstituída. Os organismos foram alimentados diariamente com algas da espécie *Raphidocelis subcapitata* e mantidos em sala climatizada sob temperatura controlada (20 ± 2ºC) e fotoperíodo 14:10 (claro/escuro).

A determinação da CL_{50} de CAD e PUT foi estabelecida por testes preliminares (0,1; 1; 10 e 100 mg. L) com neonatos de *D. magna,* realizados para a viabilização dos experimentos (dados não apresentados). Após os testes preliminares, foram definidas as concentrações definitivas de CAD e PUT (10; 16; 25,6; 40,96; 65,54; 104,86 mg. mL^{-1}). As concentrações analisadas de CAD e PUT em mistura foram as mesmas utilizadas para a espécie *D. rerio* e estão apresentadas na tabela 4.

Para a montagem dos experimentos, neonatos de *D. magna*, com menos de 24 h de vida, foram distribuídos em placas de 12 poços, contendo dois indivíduos por poço (n=24). Cada poço foi preenchido com um volume total de 5 mL da solução teste. Os organismos foram expostos por 48 h, e avaliados no início do teste, com 24 h e 48 h de exposição. Foi contabilizado o número de indivíduos mortos ou que apresentaram imobilidade. O tratamento controle (CN)

foi realizado com água reconstituída, nas mesmas condições dos outros tratamentos.

A determinação da CL_{50} foi calculada pelo método de “Probit Analysis”. Os resultados obtidos com as AB em mistura, foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA, seguido do pós-teste Dunnet ($p<0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, os resultados do presente estudo serão apresentados no modelo de artigos científicos, os quais serão submetidos a revistas especializadas para publicação.

Artigo 1: Cemitérios como fonte de contaminação ambiental: Fitogenotoxicidade das aminas biogênicas cadaverina e putrescina

Artigo 2: Avaliação da toxicidade aguda e crônica em colêmbolos (*Folsomia candida*) expostos à solo contaminado com cadaverina e putrescina

Artigo 3: Ecotoxicological evaluation of the biogenic amines cadaverine and putrescine in aquatic organisms

Artigo 4: The zebrafish as an alternative animal model for ecotoxicological research and testing

Artigo 1

Cemitérios como fonte de contaminação ambiental: Fitogenotoxicidade das aminas biogênicas cadaverina e putrescina

Ana Paula Andrade Braga[1], Letícia Rosa de Souza[1], Maria Gabriela Franco Lima[1], Matheus de Moraes Cunha Gonçalves[1], Maria Aparecida Marin-Morales[1]

São Paulo State University, Department of Biology, avenue 24-A, 1515, P.O Box 178, Rio Claro, São Paulo, 13506-900, Brazil

Resumo

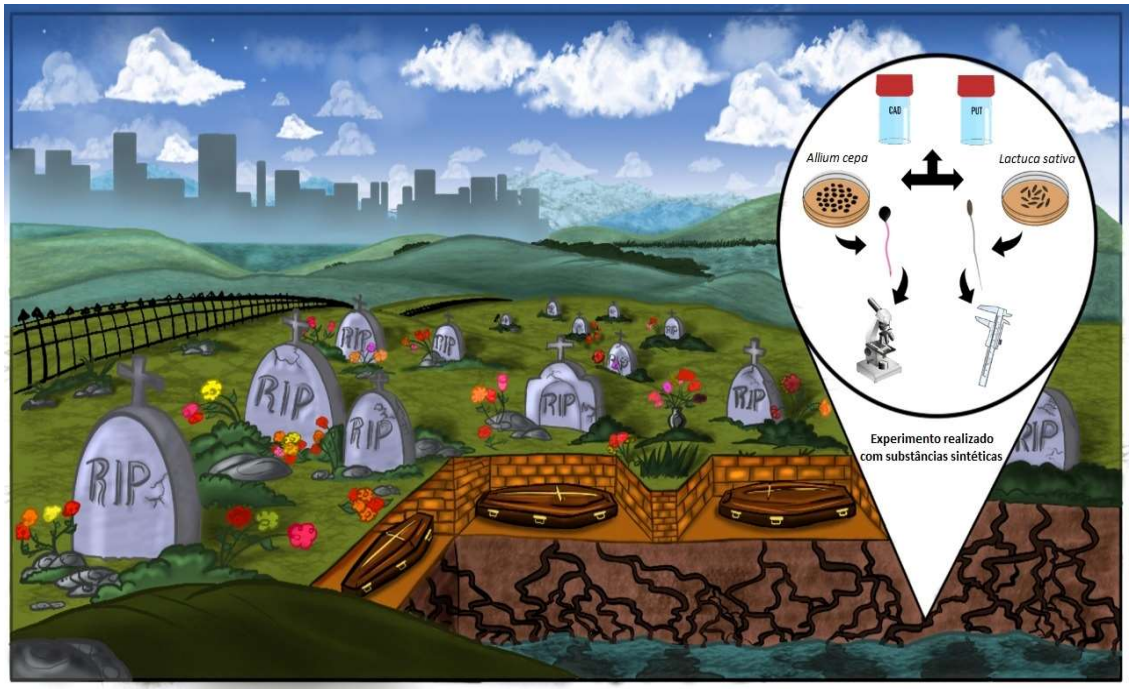
Dentre os compostos presentes no necrochorume, líquido liberado durante o processo de decomposição do corpo humano, estão as aminas biogênicas cadaverina e putrescina. Embora alguns estudos com necrochorume indiquem um potencial ecotoxicológico e riscos para a saúde pública para os ambientes cemiteriais, o conhecimento sobre este tipo de contaminação ainda é limitado. Este estudo traz informações sobre o potencial fitotóxico e citogenotóxico de duas importantes substâncias presentes no necrochorume (cadaverina e putrescina), avaliadas isoladamente e co-associadas. A fitotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de germinação e crescimento inicial de plântulas com *Lactuca sativa* e a citogenotoxicidade pelos ensaios de aberrações cromossômicas e do micronúcleo com *Allium cepa*. Os resultados de *L. sativa* mostraram efeito fitotóxico para as aminas avaliadas, por reduzir o alongamento radicular (>90%) e do hipocótilo (>80%). A associação de cadaverina e putrescina potencializou a atividade citogenotóxica por ação aneugênica em células meristemáticas de *A. cepa.* Foi observado, alterações no índice mitótico e indução de aberrações cromossômicas e nucleares, nas diferentes concentrações avaliadas. Por este resultado, é possível inferir o potencial ecotoxicogenético das aminas cadaverina e putrescina, e ressaltar a importância de mais pesquisas que avaliem os riscos das contaminações geradas em ambientes de cemitérios.

Palavras-chave: Necrochorume; *Lactuca sativa*; *Allium cepa;* cadaverina; putrescina; aberrações cromossômicas; micronúcleo

Abstract
Among the compounds present in necro-leachate, liquid released during the process of decomposition of the human body, are the biogenic amines cadaverine and putrescine. Although some studies with necro-leachate indicate a potential ecotoxicological and public health risks for cemetery environments, knowledge about this type of contamination is still limited. This study provides information on the phytotoxic and cytogenotoxic potential of two important substances present in necro-leachate (cadaverine and putrescine), evaluated separately and in co-association. Phytotoxicity was evaluated by germination test and initial growth of seedlings with *Lactuca sativa* and cytogenotoxicity by chromosomal aberration and micronucleus tests with *Allium cepa*. The results of *L. sativa* showed a phytotoxic effect for the evaluated amines, by reducing root (>90%) and shoot (>80%) elongation. The association of cadaverine and putrescine potentiated the cytogenotoxic activity by aneugenic action in meristematic cells of *A. cepa*. It was observed alterations in the mitotic index and induction of chromosomal and nuclear aberrations, in the different evaluated concentrations. From this result, it is possible to infer the ecotoxicogenic potential of cadaverine and putrescine amines and emphasize the importance of further research to assess the risks of contamination generated in cemeteries.

Keywords: Necro-leachate; *Lactuca sativa*; *Allium cepa*; cadaverine; putrescine; chromosomal aberrations; micronuclei

Graphical abstract



1. INTRODUÇÃO

O necrochorume, líquido liberado durante a decomposição cadavérica, é considerado um dos principais componentes responsáveis pelos impactos ambientais ocasionados por cemitérios. Durante o processo de putrefação, um cadáver de cerca de 70 kg pode liberar de 30 a 40 litros de necrochorume (DENT; FORBES; STUART, 2004; MOHAMMED; ABUDEIF, 2020). De acordo com Neckel et al. (2021), a lixiviação e, consequentemente, o transporte e o destino deste líquido dependem das características do solo onde ocorrem os sepultamentos. A maioria dos cemitérios não fazem tratamento prévio do necrochorume, sendo este líquido liberado diretamente no meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2019; ZYCHOWSKI; BRYNDAL, 2015). Por esta razão, os estudos relatam, cada vez mais, contaminações de solos e águas subterrâneas em torno das necrópoles (ABIA et al., 2019; ALAGBE et al., 2020; NECKEL et al., 2017).

O necrochorume é uma solução viscosa, composta de água, sais minerais e substâncias orgânicas, dentre elas, as aminas biogênicas (AB) cadaverina (CAD) e putrescina (PUT) (IOAN et al., 2017). AB são compostos nitrogenados naturalmente sintetizadas por plantas, animais e microrganismos; principalmente por processos enzimáticos de descarboxilação de aminoácidos (DEL RIO et al., 2019). CAD e PUT, quando sintetizadas endogenamente, participam de processos fisiológicos celulares essenciais como divisão, proliferação, diferenciação e crescimento (BAGNI; TASSONI, 2001). No entanto, em altas concentrações podem ser tóxicas e alterar a homeostase do organismo (GERNER; MEYSKENS, 2004; ZHOU et al., 2021).

Pesquisas que abordam o nível de toxicidade e a quantificação das AB do necrochorume ainda são escassas. Entretanto, alguns estudos mostram que, essas aminas são citotóxicas, quando em altas concentrações, e estão envolvidas com processos apoptóticos, e até mesmo neoplásicos (DEL RIO et al., 2019; NAVARRO et al., 2020; SEILER; RAUL, 2005). Wójcik et al. (2020) apontam a reatividade dessas aminas com outros compostos, como com o nitrito, formando compostos cancerígenos, como as nitrosaminas. Unal et al. (2008) também evidenciaram potencial citogenotóxico em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à diferentes concentrações de PUT e Meral et al. (2005) relatam

o efeito tóxico dessas AB sobre a germinação de sementes, crescimento de raízes e alterações cromossômicas em trigo.

As análises ecotoxicológicas realizadas com bioindicadores vegetais ganharam notoriedade nos últimos anos. De acordo com Iqbal et al. (2019), os vegetais, além de serem sensíveis aos efeitos de xenobiontes, se expõem de forma contínua (hábito séssil) aos contaminantes ambientais, o que os tornam eficientes monitores de impactos ao meio ambiente.

A porcentagem de germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas podem refletir os níveis de fitotoxicidade de uma determinada substância (CRUZ et al., 2019; SILVEIRA et al., 2017), sendo a espécie *L. sativa* um dos principais bioindicadores usados para este tipo de avaliação (ISO, 1995; USEPA, 1996). Alguns poluentes, dependendo da sua concentração, podem não interferir diretamente no crescimento das plantas, mas podem induzir danos ao material genético dos organismos. Análises realizadas com a espécie *A. cepa* têm sido frequentemente usadas como biomarcadores de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, por serem eficientes para este tipo de diagnóstico (CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019; FISKESJÖ, 1993; GRANT, 1994; GROVER; KAUR, 1999; MAZZEO et al., 2015; SOMMAGGIO et al., 2018).

Considerando que os impactos ambientais ocasionados pelo necrochorume é um tema ainda pouco explorado, torna-se necessário a investigação dos efeitos ecotoxicológicos dos componentes deste resíduo. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial fitotóxico e genotóxico das AB, CAD e PUT, isoladas e em associação, por meio dos sistemas-teste *L. sativa* e *A. cepa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias químicas avaliadas e preparo das amostras

As aminas cadaverina [(CAD) 1,5-Diaminopentano, fórmula molecular $NH_2(CH_2)_5NH_2$, peso molecular 102,18 g/mol, CAS: 461-94-2 – pureza ≥ 97%, marca Sigma) e putrescina [(PUT) 1,4-butanodiamina, fórmula molecular $C_4H_{12}N_2$, peso molecular 88,15 g/mol, CAS: 110-60-1 – pureza ≥ 99%, marca Sigma) foram avaliadas, tanto individualmente como em co-associação, quanto às suas fitotoxicidades e citogenotoxicidades.

As concentrações de exposição foram determinadas de acordo com testes preliminares (dados não apresentados), desenvolvidos com concentrações que variam de 1 a 1000 mg/kg-solo. Para a realização dos ensaios com os bioindicadores *L. sativa* e *A. cepa,* foram utilizadas as concentrações descritas na tabela 1.

O solo controle e o solo utilizado no preparo dos tratamentos estudados foram coletados no Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista (Estado de São Paulo- Brasil), como os descrito por Mazzeo et al. (2015). A avaliação da capacidade máxima de retenção de água do solo, *Water Holding Capacity* (WHC), foi obtida de acordo com a (ISO 11268-2:1998), sendo estabelecido para os testes WHC (70%). Os bioensaios foram realizados em triplicata e de forma casualizada. Os controles positivos (CP) foram realizados com Metil metano sulfonato (MMS) e com o herbicida Trifluralina e o controle negativo (CN) com água de osmose reversa.

Tabela 1: Concentrações de cadaverina, putrescina e a associação de ambas (CAD + PUT) utilizadas nos bioensaios com *L. sativa* e *A. cepa*.

Bioensaios	**Concentrações (mg/kg) de solo**				
L. sativa	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**
Cadaverina	200	400	600	800	1000
Putrescina	600	700	800	900	1000
CAD + PUT	400+400	400+1000	1000+400	1000+1000	-
A. cepa	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**
Cadaverina	200	400	600	800	1000
Putrescina	200	400	600	800	1000
CAD + PUT	600+200	600+1000	1000+200	1000+1000	-

C1 a C5. Diluições das aminas biogênicas cadaverina e putrescina, sendo a C1 a menor concentração testada e a C5 a maior.

2.2 – Bioensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

Vinte sementes de *L. sativa* (variedade Baia Periforme) foram expostas à germinação em placas de Petri contendo 30 g de solo contaminado artificialmente com as concentrações de CAD, PUT e as associações de ambas. As placas foram mantidas em B.O.D (22 ºC ± 1 ºC), sem fotoperíodo, por um período de 120 horas. Para o CN, foi utilizada água de osmose reversa e para o

CP, sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M). Após o período de incubação, foram calculadas as porcentagens de germinação das sementes e avaliadas as alterações do alongamento das estruturas radiculares das plântulas. O índice de germinação (IG) foi calculado de acordo com as equações propostas por Tiquia et al. (1996). Para a análise de crescimento vegetativo inicial dessas plantas, foram mensurados, com o auxílio de um paquímetro digital, o comprimento da radícula e hipocótilo. Os dados obtidos foram comparados, estatisticamente, com os dados dos controles.

2.3 – Bioensaio de citogenotoxicidade com *Allium cepa*

Cem sementes de *A. cepa* (Baia Periforme) foram expostas à germinação em placas de Petri contendo 30 g de solo contaminado com as concentrações descritas na tabela 1. O CN foi realizado com água de osmose reversa. O Metilmetano sulfonato 10 mg/L (MMS) e o herbicida Trifluralina 0,84 $mg.kg^{-1}$ foram usados como CP. As placas foram mantidas em B.O.D (22 ºC ± 1 ºC) por 120 horas, com fotoperíodo claro/escuro de 12 h. Após o período de germinação, as radículas com aproximadamente 2 cm de comprimento foram selecionadas, fixadas em Carnoy (álcool/ ácido acético 3:1, v:v) e armazenadas nessa solução de fixação a 4 ºC, até o uso das mesmas nos ensaios. Posteriormente, foram confeccionadas lâminas com as regiões meristemáticas, seguindo o protocolo descrito por Leme and Marin-Morales (2009).

O efeito citotóxico das aminas foi avaliado pelo índice mitótico (IM), razão entre o número de células em divisão e o número total de células; e a genotoxicidade pelo ensaio de alterações cromossômicas e nucleares (perdas, pontes e aderência cromossômica, C-metáfase, brotos nucleares, dentre outros). Já as alterações como quebras cromossômicas e micronúcleos foram consideradas indicativos de mutagenicidade. Esses parâmetros foram analisados em microscopia de luz. Foram avaliadas 12 lâminas/tratamento, sendo contabilizadas 500 células/lâminas, 6.000 células/tratamento.

2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo software STATISTICA 7.0. Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para a análise de comparação de médias entre

os tratamentos e os controles foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0, onde os dados (não-paramétricos) foram submetidos ao teste Mann-Whitney à 5% de probabilidade (GONÇALVES et al., 2020; MAZZEO et al., 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Bioensaio de fitotoxicidade utilizando *Lactuca sativa* como bioindicador

Historicamente, a espécie *L. sativa* é empregada em estudos de alelopatia, principalmente devido à rápida germinação de suas sementes e alta sensibilidade a uma variedade de poluentes ambientais (SILVEIRA et al., 2017; TIGRE et al., 2012).

Os ensaios de observação macroscópicos foram ganhando notoriedade ao longo do tempo e destacaram-se por sua simplicidade, sensibilidade e boa relação custo-benefício (PRIAC; BADOT; CRINI, 2017). Atualmente, os parâmetros de índice de germinação (IG) e do desenvolvimento inicial de plântulas vêm sendo utilizados em monitoramento ambiental, por serem eficientes indicativos de fitotoxicidade de contaminantes ambientais (LYU et al., 2018). Por esta razão, esses marcadores foram utilizados no presente estudo para avaliar o potencial tóxico das AB, CAD e PUT, tanto isoladas como associadas entre si.

Como apresentado na tabela 2, os ensaios de toxicidade, realizados com as aminas CAD e PUT, não mostraram efeito tóxico para a porcentagem de germinação de sementes de *L. sativa* (>80%). No entanto, o IG (porcentagem de germinação da semente, em relação ao alongamento radicular) foi significativamente afetado, tanto para os resultados com as AB isoladas, como com as associadas (Tabela 2). O IG é considerado um teste rápido e sensível para avaliação de toxicidade de diferentes substâncias (TIQUIA; TAM; HODGKISS, 1997). De acordo com Tiquia et al. (1996), não há indicativo de toxicidade, quando o valor do IG é superior a 80%, ao passo que, IG inferior à 30% já indica alta toxicidade. Além disso, substâncias-teste que induzem IG inferior a 60% não podem ser utilizadas com segurança em solos agrícolas (GONÇALVES et al., 2020).

Tabela 2: Germinação de sementes, elongação radicular e índice de germinação de *L. sativa* expostas à diferentes concentrações de cadaverina, putrescina e a associação de ambas.

Tratamentos (mg/kg)	Germinação de sementes (%)	Diminuição da Elongação Radicular (%)	IG (%) - Índice de Germinação
Cadaverina			
CN	100±0	100±0	100±0
C1	86.39±14.19	70.78±6.75*	61.65±15.14*
C2	96.85±10.63	66.90±6.87*	65.01±11.41*
C3	87.86±15.63	51.33±13*	46.44±20.01*
C4	91.76±15.49	50.40±6.22*	46.88±13.34*
C5	93.52±15.94	41.76±5.68*	39.64±12.33*
CP	0±0*	0±0*	0±0*
Putrescina			
CN	100±0	100±0	100±0
C1	105.45±5.55	58.21±2.37*	61.43±5.12*
C2	98.43±6.17	48.65±4.40*	47.74±2.56*
C3	94.53±10.97	34.02±5.81*	32.54±8.72*
C4	92.98±12.15	28.48±10.01*	27.03±11.85*
C5	96.76±7.97	21.90±2.10*	21.24±3.21*
CP	0±0*	0±0*	0±0*
Associação			
CN	100±0	100±0	100±0
C1	94.82±5.26	46.52±13.65*	43.97±12.66*
C2	100.37±10.56	18.63±0,64*	18.69±2.01*
C3	100.19±10.82	24.50±5.23*	24.65±6.22*
C4	91.67±12.91	10.20±0.13*	9.35±1.34*
CP	0±0*	0±0*	0±0*

CN - Controle Negativo (água destilada); CP – Controle Positivo ($ZnSO_4.7H_2O$); IG. índice de germinação; C1 a C5, diluições das aminas biogênicas cadaverina e putrescina, sendo a C1 a menor concentração testada e a C5 a maior; Concentrações apresentadas na tabela 1; *. diferença significativa em comparação ao CN ($p < 0.05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os testes embasados no crescimento inicial de plantas são comumente usados para a avaliação de fitotoxicidade de poluentes ambientais (YANG et al., 2020), sendo a espécie *L. sativa* uma das plantas mais utilizadas para este fim (PANTANO et al., 2021). Os resultados com *L. sativa,* apresentados na figura 1, mostram fitotoxicidade para as AB, CAD e PUT, pela inibição do alongamento da radícula e do hipocótilo do bioindicador. De acordo com Lyu et al. (2018), a sensibilidade do alface, quanto ao parâmetro de inibição do alongamento radicular, é maior, quando comparado com outras espécies vegetais.

Na figura 1, é possível observar que todas as concentrações testadas de CAD (Figura 1A) e das associações de CAD + PUT (Figura 1C) levaram a

inibição do alongamento das raízes (>50% e >90%, respectivamente) e dos hipocótilos (>20% e 80%, respectivamente) de *L. sativa*, portanto, foram citotóxicas para esse bioindicador. Os resultados desses bioensaios para PUT também mostraram toxicidade para todas as concentrações testadas, com exceção da elongação do hipocótilo da C1. Para essa última AB, foi observado que C5 (1000 mg) induziu redução do crescimento radicular e do hipocótilo em 79% e 54%, respectivamente (Figura 1B). Foi observado nos ensaios realizados que as AB apresentaram, de maneira geral, fitotoxicidade dose dependente. Os resultados ainda mostraram que a associação das AB potencializou a fitotoxicidade em plântulas de alface, provavelmente por um efeito sinérgico.

A toxicidade sinérgica entre as AB também foi relatada em outro estudo relacionado a toxicologia alimentar (DEL RIO et al., 2019). Embora, o conhecimento atual da fitotoxicidade de CAD e PUT ainda seja limitado, alguns autores (RAJPAL; TOMAR, 2020; UNAL; PALAVAN-UNSAL; TUFEKCI, 2008; WÓJCIK; ŁUKASIEWICZ; PUPPEL, 2020) apontam uma ação dessas AB sobre o desenvolvimento vegetal. Estudos realizados por De Agazio et al. (1995), com exposição exógena de diferentes poliaminas sob *Zea mays*, também mostraram efeitos inibitórios sobre várias atividades celulares. A fitotoxicidade de putrescina também é descrita por Meral et al. (2005), onde os autores relatam a inibição do crescimento radicular em *Arabidopsis thaliana* expostas à altas concentrações desta AB, o que corrobora com o presente estudo. Além disso, os autores também relatam que a PUT foi capaz de diminuir o IG de três espécies de trigo com diferentes níveis de ploidia.

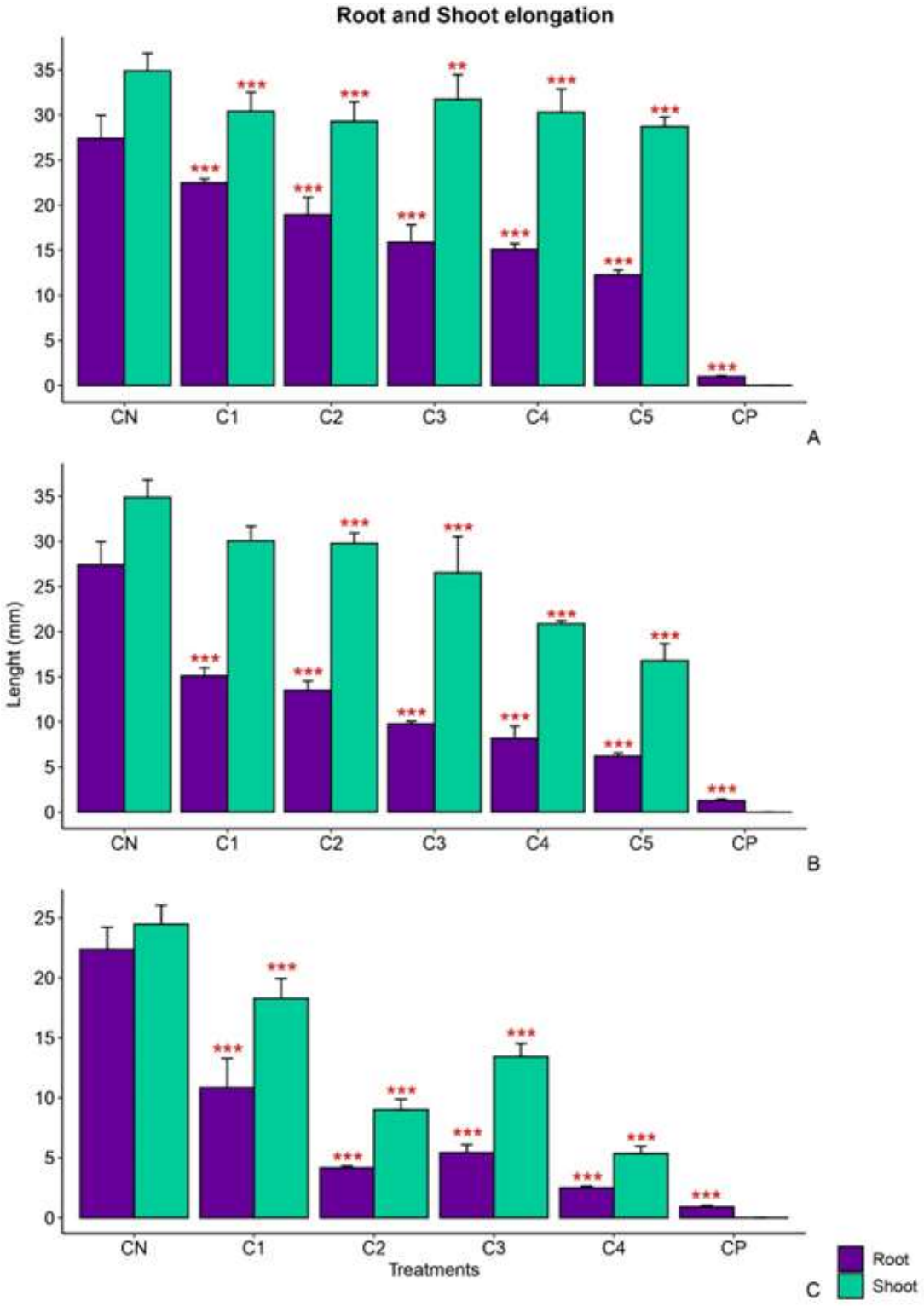


Figura 1. Elongação do sistema radicular – hipocótilo em plântulas de *L. sativa*. **A.** Gráfico das diferentes concentrações testadas de cadaverina; **B.** Gráfico das diferentes concentrações testadas de putrescina; **C.** Gráfico das diferentes concentrações testadas das associações de cadaverina e putrescina; CN. Controle negativo; CP. Controle positivo; Concentrações apresentadas na tabela 1; * - diferença significativa em relação ao CN ($p < 0.05$ - teste Mann-Whitney).

3.2 Bioensaio de citogenotoxicidade e de potencial mutagênico utilizando *Allium cepa* como bioindicador

Bioensaios de alterações cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico com o bioindicador *A. cepa* são cada vez mais recorrentes em avaliação da qualidade ambiental. Esse sistema-teste vegetal apresenta características favoráveis para esse fim, como cromossomos grandes e em número reduzido (2n=16) e por ser um sistema de alta sensibilidade a diferentes poluentes ambientais.

O IM é um importante biomarcador de citotoxicidade, sendo muito eficiente para ser aplicado em monitoramento ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Como pode ser observado na figura 2 (ensaio do IM com *A. cepa*), dentre as concentrações testadas de CAD, PUT e CAD + PUT, a CAD foi citotóxica para C1 (200 mg), cujos IM foram inferiores (>20%) ao do CN mitótico (Figura 2A); a PUT foi citotóxica para C3 (600 mg), com valores superiores de IM (>20%), em relação aos do CN (Figura 2B). Ainda pelos resultados obtidos (Figura 2C), é possível inferir que houve uma potencialização do efeito citotóxico quando as AB foram co-associadas (CAD + PUT), pois todas as concentrações testadas (C1, C2, C3 e C4) ocasionaram distúrbios no IM. A concentração C4 (combinação das concentrações mais elevadas de CAD e PUT) inibiu a divisão celular (>80%) de *A. cepa,* quando comparadas com o CN (Figura 2C).

Pela comparação entre os resultados obtidos com os bioindicadores vegetais utilizados no presente estudo, foi possível observar que as AB co-associadas (CAD + PUT) induziram um maior efeito sobre a inibição do alongamento radicular em *L. sativa*, assim como maior inibição no ciclo celular em *A. cepa*. De acordo com Harashima and Schnittger (2010), as divisões celulares do tecido meristemático estão intimamente associados ao crescimento radicular. Estudos sobre a toxicidade de agrotóxico, realizados por Gonçalves et al. (2020) com os mesmos bioindicadores, demonstram resultados similares aos observados no presente estudo, onde os autores também correlacionam a proliferação celular com o desenvolvimento de plantas. A citotoxicidade de CAD e PUT também é relatada nos estudos de Del Rio et al. (2019), onde os autores descrevem a citotoxicidade em tempo real dessas AB em cultura de células intestinais humanas. Ambas as substâncias foram capazes de induzir necrose celular. No estudo de Del Rio acima citado, a CAD se mostrou três vezes mais citotóxica que putrescina. Os autores ainda mencionam efeito sinergético das

aminas, quando estas estão associadas entre si, dados estes que corroboram com o presente estudo. Os resultados do presente estudo também corroboram os descritos por Unal et al. (2008), onde os autores mencionam aumento do IM de células meristemáticas de *A. cepa* expostas à PUT, assim como efeito sinérgico dessa substância, quando associadas com outras AB.

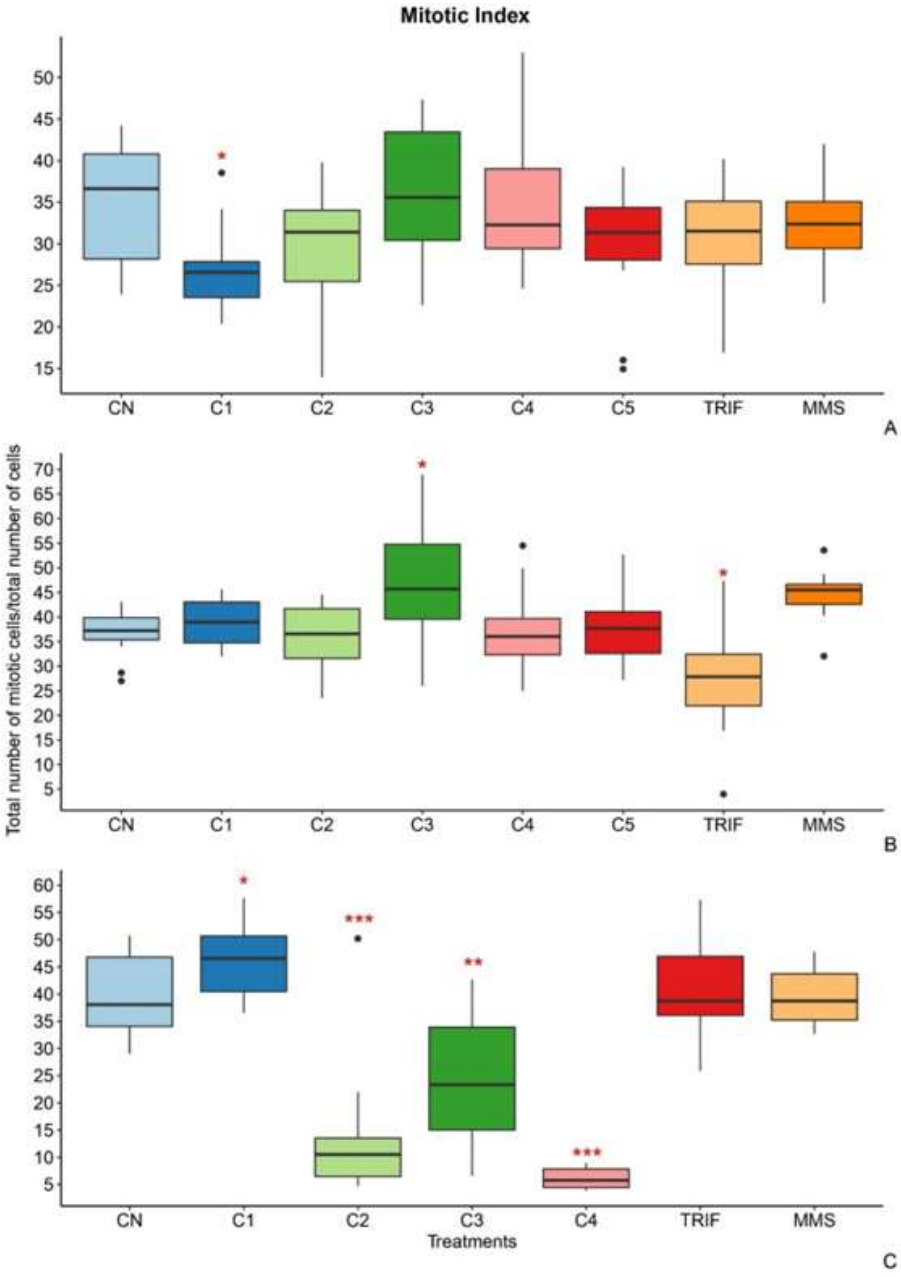


Figura 2. Índice Mitótico de células meristemáticas de *A. cepa*. **A.** Concentrações testadas de cadaverina; **B.** Concentrações testadas de putrescina; **C.** Concentrações testadas das associações de cadaverina e putrescina; CN. Controle negativo; TRIF. Trifluralina (controle positivo); MMS. Metil metanosulfonato (controle positivo); Concentrações apresentadas na tabela 1; *. Diferença significativa, em comparação ao CN ($p < 0.05$) pelo teste Mann-Whitney.

Os resultados relacionados à genotoxicidade, obtidos pelo ensaio de aberrações cromossômicas (AC) em *A. cepa*, estão apresentados na figura 3. A concentração C3 (600 mg) da AB CAD induziu AC (C-metáfase, aderência e ponte cromossômica) em *A. cepa*. Esta amina também mostrou potencial mutagênico (quebras cromossômicas e micronúcleos), para as quatro maiores concentrações das cinco testadas (Figura 3A). Para PUT, nenhuma das concentrações testadas foram genotóxicas ou potencialmente mutagênica para *A. cepa*, quando comparados com o CN (Figura 3B). Em contrapartida, mais uma vez, ficou evidente a potencialização dos efeitos da CAD pela PUT, pois todos os tratamentos realizados com as AB associadas, com exceção do C4, se mostraram mais tóxicos quando comparado com os resultados dessas substâncias isoladas. Neste estudo, foram registrados diferentes tipos de AC, sendo que as mais frequentes foram micronúcleos, brotos nucleares, aderências cromossômicas, células poliploides e polinucleada. Ficou ainda evidente a alta frequência de células micronucleadas para todos os tratamentos realizados com CAD, bem como para os tratamentos com as aminas co-expostas (Figura 3).

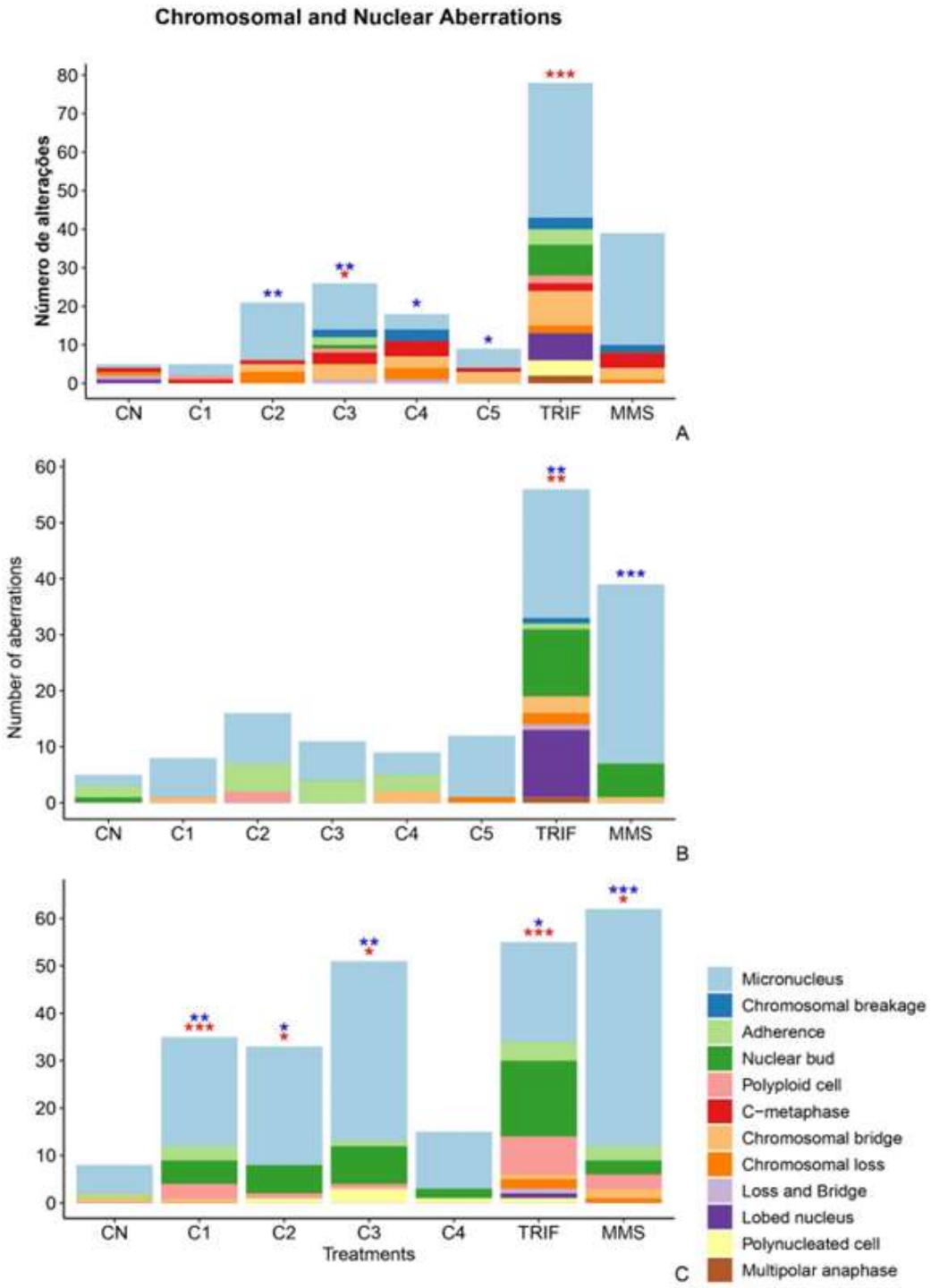


Figura 3. Alterações cromossômicas indicadoras de genotoxicidade (* vermelho) e de potencial mutagênico (* azul), em células meristemáticas de *A. cepa*. **A**. Gráfico das diferentes concentrações testadas de cadaverina. **B.** Gráfico das diferentes concentrações testadas de putrescina. **C.** Gráfico das diferentes concentrações testadas das associações de cadaverina e putrescina. CN. Controle negativo; TRIF. Trifluralina (controle positivo); MMS. Metil metanosulfonato (controle positivo) Concentrações apresentadas na tabela 1; *. diferença significativa em comparação ao CN ($p < 0.05$) pelo teste Mann-Whitney.

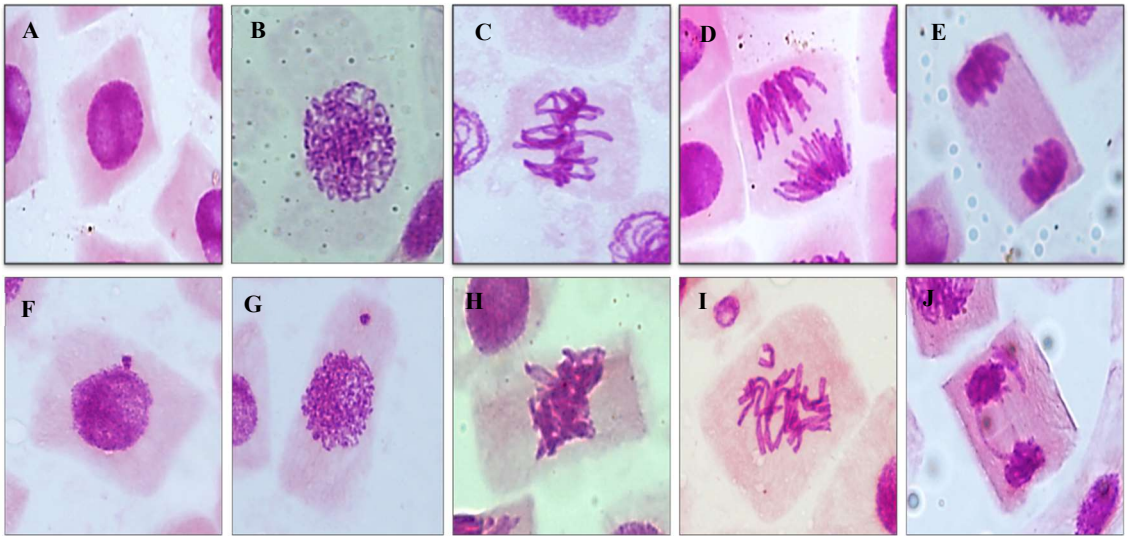


Figura 4: A-E. Células normais do ciclo celular de *A. cepa*: A. Interfase, B. Prófase, C. Metáfase, D. Anáfase, E. Telófase; F-J: Alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à cadaverina e à putrescina: F. Interfase com broto, G. Prófase com micronúcleo, H. Metáfase com aderência cromossômica; I. Metáfase com perda cromossômica; J. Telófase com ponte cromossômica. Fonte: Registrado pela autora.

Os ensaios de alterações cromossômicas e nucleares, realizados com bioindicadores vegetais, têm sido muito usados em monitoramento ambiental, por se mostrarem preditivos de efeitos genotóxicos e do potencial mutagênico de contaminantes ambientais. A espécie *A. cepa* é um dos bioindicadores vegetais mais indicados para este fim (CRUZ et al., 2019; MAZZEO et al., 2015; PAMPLONA-SILVA et al., 2020; SOMMAGGIO et al., 2018; UNAL; PALAVAN-UNSAL; TUFEKCI, 2008). A avaliação dos efeitos toxicológicos de CAD e PUT por essas técnicas ainda é pouco explorada. Contudo, alguns estudos já observaram indução de AC, como pontes cromossômicas, C-metáfase e micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* expostas as poliaminas putrescina, espermidina e espermina (UNAL; PALAVAN-UNSAL; TUFEKCI, 2008). Estudos de Kaur-Sawhney et al. (1980) mostraram alta frequência de células binucleadas em protoplastos de folhas de aveia expostos à diferentes concentrações de cadaverina. Davidson and Anderson (1960) observaram indução de aderência cromossômica e micronúcleos em células de *Vicia faba* expostas a soluções de putrescina, cadaverina e espermidina. Os resultados desses estudos corroboram com os dados apresentados do presente estudo, o que confirma a ação genotóxica e o potencial mutagênico das aminas CAD e PUT.

De acordo com Unal et al. (2008), diferentes poliaminas exógenas, entre elas a CAD e a PUT, podem se associar aos cromossomos durante a mitose e induzir mudanças estruturais na molécula de DNA. Roca et al. (2020) citam ainda que as AB podem estar envolvidas com o aumento da condensação cromossômica, a regulação da expressão gênica e a inativação de constituintes celulares. Fernandes; Mazzeo e Marin-Morales (2009) destacam que uma substância é considerada clastogênica, quando a mesma interage diretamente com a molécula de DNA. Neste caso, a substância pode induzir alterações como, por exemplo, quebras cromossômicas, que podem decorrer em mutações. De acordo com os mesmos autores, um composto aneugênico interfere na integridade de estruturas citoplasmáticas, como os fusos mitóticos, induzindo alterações como poliploidização, C-metáfases, perdas e aderências cromossômicas, dentre outras. Assim, o aumento de anormalidades como C-metáfases, aderências e perdas cromossômicas, bem como células micronucleadas, podem ter ocorrido devido à ação aneugênica das substâncias testadas, no qual podem estar atribuídos à interferência na dinâmica dos microtúbulos e não polimerização dos fusos mitóticos (CHAUHAN; SAXENA; GUPTA, 1999; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; GONÇALVES et al., 2020; ÖSTERBERG; PERSSON; BJURSELL, 1984). Este tipo de alteração é resultante de um efeito altamente tóxico, muitas vezes irreversível, que pode levar a célula à morte (LEME; MARIN-MORALES, 2009). De acordo com Fernandes et al. (2007), o aumento na condensação dos cromossomos podem promover aderências cromossômicas, originando outras anormalidades que levam a danos severos na molécula de DNA, como pontes e quebras cromossômicas (GONÇALVES et al., 2020; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004). Os dados obtidos no presente estudo reforçam estas afirmações, pois foram observadas alterações no ciclo celular de *A. cepa*, mediadas pela ação das AB estudadas.

Neste estudo, foi observado que as AB CAD e PUT apresentaram potencial mutagênico para quase todos os tratamentos realizados, visto que houve aumento na frequência de quebras cromossômicas e, principalmente, de células portadoras de micronúcleos (MN). De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), a formação de MN se deve a danos não reparados durante a divisão celular, ou até mesmo reparados erroneamente. A presença de células

micronucleadas é considerada um importante marcador de evento mutagênico e, por esta razão, o ensaio do MN é muito utilizado para a detecção de agentes mutagênicos ambientais (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, 2009; GONÇALVES et al., 2020; LEME; MARIN-MORALES, 2009; SANTOS; SOMMAGGIO; MARIN-MORALES, 2022). Os MN são estruturas semelhantes ao núcleo, contudo, de tamanho reduzido (Figura 4G). Essas alterações podem ser originadas de AC do tipo quebras e perdas cromossômicas (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, 2009; GONÇALVES et al., 2020; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Os resultados deste estudo corroboram com os descritos por Unal et al. (2008), onde os autores também observaram a presença de MN em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com as poliaminas putrescina, espermidina e espermina. Contudo, devido à escassez de dados na literatura científica sobre o comprometimento ambiental por contaminantes de cemitério e pelos poucos estudos com as AB, torna-se necessário o desenvolvimento de mais estudos que possam complementar os dados toxicológicos já existentes destas AB. Pelos dados aqui apresentados, as AB são citogenotóxicas, com alto potencial mutagênico, o que pode estar colocando em risco a saúde das pessoas envolvidas ocupacionalmente com esses contaminantes, bem como a segurança ambiental.

4. CONCLUSÃO

Este estudo traz relevantes contribuições sobre as características tóxicas das AB, CAD e PUT, substâncias estas altamente presentes no necrochorume e, consequentemente nos ambientes cemiteriais. Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que estas aminas apresentam potencial fitotóxico, portanto prejudiciais para a integridade dos ecossistemas. Também foi verificado no estudo que a CAD é mais citogenotóxica e potencialmente mais mutagênica que a PUT, e que, quando associadas entre si, a PUT potencializa ainda mais o efeito da CAD. Estes dados alertam para toxicidade dos ambientes de cemitérios, pois, durante a decomposição dos cadáveres, essas AB são liberadas simultaneamente, o que aumenta os riscos de exposição humana a esses contaminantes. Ainda foi observado neste estudo que o modo de ação dessas aminas pode ser por aneugenicidade e clastogenicidade, efeitos estes também potencializados quando as aminas estão associadas entre si. Os

bioindicadores (*L. sativa* e *A. cepa*) utilizados na presente avaliação se mostraram sensíveis e eficientes na detecção dos efeitos tóxicos e danos celulares induzidos pelas substâncias-teste. Nossos resultados aumentam a evidência ecotoxicológica das AB putrefativas encontradas no necrochorume, e traz um alerta à comunidade científica sobre a contaminação ambiental e o risco a saúde pública gerados em cemitérios. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados para melhor elucidarmos o modo de ação e o grau de toxicidade dessas substâncias envolvidas no processo de decomposição cadavérica.

Referências

ABIA, A. L. K. et al. Microbial life beyond the grave: 16S rRNA gene-based metagenomic analysis of bacteria diversity and their functional profiles in cemetery environments. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 831–841, 2019.

ALAGBE, E. E. et al. Contamination Assessment of Underground Water around a Cemetery: Case study of Ayobo cemetery in Lagos, Nigeria. **International Journal of Engineering Research and Technology**, v. 13, n. 6, p. 1283–1288, 2020.

BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. **Amino Acids**, v. 20, n. 3, p. 301–317, 2001.

CAPELLA ROCA, B. et al. Altered gene expression in CHO cells following polyamine starvation. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 6, p. 927–936, 2020.

CARITÁ, R.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 21, p. 21475–21483, 2019.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of Allium cepa. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, n. 3, p. 181–189, 1999.

CRUZ, J. M. et al. Comparative study of phytotoxicity and genotoxicity of soil contaminated with biodiesel, diesel fuel and petroleum. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 4, p. 449–456, 2019.

DAVIDSON, D.; ANDERSON, N. G. Chromosome coiling: Abnormalities induced by polyamines. **Experimental Cell Research**, v. 20, n. 3, p. 610–613, 1960.

DE AGAZIO, M. et al. Inhibition of maize primary root elongation by spermidine: Effect on cell shape and mitotic index. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 14, n. 2, p. 85–89, 1995.

DEL RIO, B. et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

DENT, B. B.; FORBES, S. L.; STUART, B. H. Review of human decomposition processes in soil. **Environmental Geology**, v. 45, n. 4, p. 576–585, 2004.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of Allium cepa exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. 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.

FISKESJÖ, G. The allium test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 8, n. 3, p. 291–298, 1993.

GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 10, p. 781–792, 2004.

GONÇALVES, M. et al. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of composted tannery sludge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 27, p. 34495–34502, 2020.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research Regular Papers**, v. 310, n. 2, p. 175–185, 1994.

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 183–188, 1999.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 66–74, 2010.

IOAN, B. G. et al. The chemistry decomposition in human corpses. **Revista de Chimie**, v. 68, n. 6, p. 1450–1454, 2017.

IQBAL, M. et al. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. **Chemistry International**, v. 5, n. 1, p. 1–80, 2019.

ISO - International Organization for Standardization. **Soil Quality-determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora. Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence of Higher Plants**. ISO 11269-2. Geneva, Switzerland, 1995.

KAUR-SAWHNEY, R.; FLORES, H. E.; GALSTON, A. W. Polyamine-induced DNA Synthesis and Mitosis in Oat Leaf Protoplasts. **Plant Physiology**, v. 65, n. 2, p. 368–371, 1980.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LYU, J. et al. Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in Lactuca sativa L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, n. July 2017, p. 225–232, 2018.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluent using the Allium cepa test system. **Cytologia**, v. 69, n. 4, p. 399–408, 2004.

MAZZEO, D. E. C. et al. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the Allium cepa test. **Ecological Indicators**, v. 56, p. 60–69, 2015.

MERAL, U.; ISMAILOGLU, I.; PALAVAN-UNSAL, N. The effect of putrescine and difluoromethylornithine on cell division activity of wheat in different ploidy level. **Caryologia**, v. 58, n. 1, p. 15–20, 2005.

MOHAMMED, M. A.; ABUDEIF, A. M. Use of the geophysical approaches for studying the environmental impact assessment of the human burying techniques to the soil and groundwater: A case study of Geheina cemeteries, Sohag, Egypt. **Journal of African Earth Sciences**, v. 172, n. September, p. 104010, 2020.

NAVARRO, J. et al. Analytical possibilities of Putrescine and Cadaverine enzymatic colorimetric

determination in tuna based on diamine oxidase: A critical study of the use of ABTS. **Talanta**, v. 208, n. September 2019, p. 120392, 2020.

NECKEL, A. et al. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. **urbe. Revista Brasileira de Gestão Urbana**, 2017.

NECKEL, A. et al. Hazardous elements in the soil of urban cemeteries; constructive solutions aimed at sustainability. **Chemosphere**, v. 262, 2021.

OLIVEIRA, L. O. DE et al. The Analysis of the Presence of Necrochorume in Communities in the Vicinity of the Cemetery Parque de Manaus and Nossa Senhora Aparecida. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 6, n. 11, p. 454–459, 2019.

ÖSTERBERG, R.; PERSSON, D.; BJURSELL, G. The condensation of dna by chromium (Iii) ions. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 2, n. 2, p. 285–290, 1984.

PAMPLONA-SILVA, M. T. et al. DNA damages induced by both endotoxin and exotoxin produced by cyanobacteria. **Chemosphere**, v. 254, p. 126716, 2020.

PANTANO, G. et al. Toxicity of the sawdust used for phosphorus recovery in a eutrophic reservoir: experiments with Lactuca sativa and Allium cepa. **Environmental Science and Pollution Research**, 2021.

PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Évaluation de la phytotoxicité d'eaux de rejets via Lactuca sativa : paramètres des tests de germination et d'élongation. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188–194, 2017.

RAJPAL, C.; TOMAR, P. C. Effect of cadaverine on cultivars of tomato [lycopersicon esculentum (l.) em. thell] under multiple stress. **Plant Archives**, v. 20, p. 1706–1709, 2020.

SANTOS, T.; SOMMAGGIO, L. R. D.; MARIN-MORALES, M. A. Phyto-genotoxicity assessment of different associations between sludges from Water and Sewage Treatment Plants, before and after the bioremediation process. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 26, p. 40029–40040, 2022.

SEILER, N.; RAUL, F. Polyamines and apoptosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 623–642, 2005.

SILVEIRA, G. L. et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using Allium cepa L. and Lactuca sativa L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, 2017.

SOMMAGGIO, L. R. D. et al. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, n. May 2017, p. 550–557, 2018.

TIGRE, R. C. et al. Allelopathic and bioherbicidal potential of Cladonia verticillaris on the germination and growth of Lactuca sativa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 125–132, 2012.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93, n. 3, p. 249–256, 1996.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of turning frequency on composting of spent pig-manure sawdust litter. **Bioresource Technology**, v. 62, n. 1–2, p. 37–42, 1997.

UNAL, M.; PALAVAN-UNSAL, N.; TUFEKCI, M. A. Effects of polyamines and polyamine biosynthetic inhibitors on mitotic activity of Allium cepa root tips. **Acta Biologica Hungarica**, v. 59, n. 1, p. 93–102, 2008.

USEPA. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. **Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test**. EPA 712-C-96-154. 1996.

WÓJCIK, W.; ŁUKASIEWICZ, M.; PUPPEL, K. Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. October, 2020.

YANG, L. et al. Estimating the synergistic and antagonistic effects of dual antibiotics on plants through root elongation test. **Ecotoxicology**, 2020.

ZHOU, R. et al. Temporal succession of water microbiomes and resistomes during carcass decomposition in a fish model. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, n. August 2020, p. 123795, 2021.

ZYCHOWSKI, J.; BRYNDAL, T. Impact of cemeteries on groundwater contamination by bacteria and viruses - A review. **Journal of Water and Health**, v. 13, n. 2, p. 285–301, 2015.

Artigo 2

Avaliação do potencial ecotoxicológico de aminas biogênicas derivadas de putrefação cadavérica pelo bioindicador *Folsomia candida*

Ana Paula Andrade Braga[1], Matheus de Moraes Cunha Gonçalves[1], Cleiton Pereira de Souza[1], Maia Aparecida Marin-Morales[1*]

[1]Universidade Estadual de São Paulo, Departamento de Biologia, Av: 24ª, 1515, P.O Box 178, Rio Claro, São Paulo, 13506-900, Brasil

Resumo

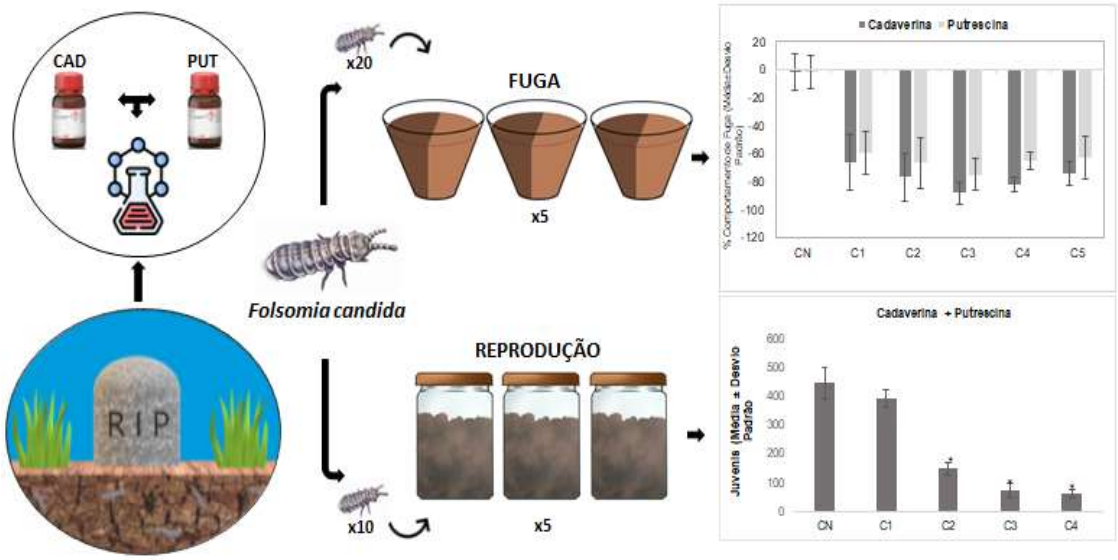
Nas últimas décadas tem-se levantado questões sobre o risco de contaminação ambiental proveniente de cemitérios. O necrochorume, líquido liberado durante a decomposição cadavérica, é considerado o principal responsável pelos impactos de tais ambientes. As aminas biogênicas cadaverina e putrescina fazem parte da composição do necrochorume e apresentam diferentes níveis de toxicidade, para diversos organismos. No entanto, ainda são limitados os estudos relacionados a contaminação de ambientes cemiteriais, sobretudo os que avaliem o potencial ecotoxicológico destas substâncias. Os invertebrados terrestres, incluindo colêmbolos e minhocas, são os bioindicadores mais utilizados para avaliar os impactos de contaminantes do solo. Como não existem dados sobre a toxicidade aguda e crônica de colêmbolos expostos a cadaverina e putrescina, o objetivo deste estudo foi avaliar a potencial tóxico de ambas as aminas, sob o efeito comportamental de fuga e de indução de alterações na reprodução da espécie *Folsomia candida*. Os colêmbolos foram expostos a solos contaminados com diferentes concentrações de cadaverina e putrescina, e diferentes combinações dessas aminas. Para avaliação do teste de fuga e reprodução, os indivíduos foram expostos por períodos de 48 h e 28 dias, respectivamente. Os resultados obtidos no teste de fuga, mostraram que os colêmbolos tiveram preferência para o solo contaminado, para todos os tratamentos realizados. Os ensaios de avaliação crônica (teste de reprodução) mostraram que a reprodução de colêmbolos foi afetada, pois houve redução do número total de juvenis, em especial pelas associações das aminas cadaverina e putrescina. Pelos resultados obtidos no estudo, é possível inferir que os métodos aplicados nesta pesquisa trouxeram informações que contribuirão para o melhor conhecimento da toxicidade das aminas biogênicas putrefativas, uma vez que há poucos estudos ecotoxicológicos realizados com essas aminas, sobretudo com as de ambientes cemiteriais.

Palavras-chave: Cemitérios, necrochorume, aminas biogênicas, colêmbolos, comportamento de fuga, teste de reprodução

Abstract
In recent decades, questions have been raised about the risk of environmental contamination from cemeteries. The necro-leachate, liquid released during cadaveric decomposition, is considered the main responsible for the impacts of such environments. The biogenic amines cadaverine and putrescine are part of the composition of necro-leachate and have a certain toxicity for different organisms. However, studies related to the contamination of cemetery environments are still limited, especially those that assess the ecotoxicological potential of these substances. Terrestrial invertebrates, including springtails and earthworms, are the most used bioindicators to assess the impacts of soil contaminants. As there are no data on the acute and chronic toxicity of springtails exposed to cadaverine and putrescine, the objective of this study was to evaluate the toxic potential of both amines, under the behavioral effect of avoidance and induction of alterations in the reproduction of the species *Folsomia candida*. Springtails were exposed to soils contaminated with different concentrations of cadaverine and putrescine, and different mixtures of these amines. For evaluation of the avoidance and reproduction test, the individuals were exposed for periods of 48 h and 28 days, respectively. The results obtained in avoidance test showed that springtails had preference for the treated soil, for all treatments carried out. The chronic evaluation assays (reproduction test) showed that the reproduction of springtails was affected, as there was a reduction in the total number of juveniles, especially due to the mixtures of cadaverine and putrescine amines. From the results obtained in the study, it is possible to infer that the methods applied in this research brought information that will contribute to a better understanding of the toxicity of putrefactive biogenic amines, since there are few ecotoxicological studies carried out with these amines, especially with those from cemetery environments.

Keywords: Cemeteries, *Folsomia candida*, necro-leachate, biogenic amines, avoidance teste, reproduction test

Graphical abstract



1. INTRODUÇÃO

A poluição do solo vem se tornando, cada vez mais, motivo de grande preocupação para a sociedade e para as autoridades (CETESB, 2023). Este tipo de poluição tem como principais fontes antropogênicas a industrialização e a expansão urbana desordenada (GAN et al., 2019). Dentre as fontes poluidoras de origem urbana, pode-se destacar as atividades de putrefação cadavérica, comuns em ambientes de cemitérios. Nesses ambientes são encontrados contaminantes das mais diversas classes, como por exemplo compostos químicos orgânicos e inorgânicos e agentes microbiológicos, bem como resíduos sólidos, como flores e lixo em geral (NECKEL et al., 2021), conferindo a esses locais uma característica de poluição complexa. Esse tipo de poluição se agravou recentemente em todo o mundo, devido ao aumento do número de mortes decorrente da pandemia Sars-CoV-2/19 (GÓMEZ et al., 2022; GONÇALVES et al., 2022).

Durante a decomposição do corpo humano, que se inicia logo após a morte do indivíduo, é liberado um líquido de cor (marrom acinzentado) e odor fétido característico, denominado de necrochorume. Esse líquido é produzido em larga escala (cadáver de cerca de 70 kg pode produzir até 40L de necrochorume) e apresenta característica tóxica, sendo então o principal responsável pela contaminação dos ambientes de cemitérios (DENT, FORBES e STUART, 2004). O necrochorume em condições favoráveis percola no solo e atinge as águas subterrâneas (GÓMEZ et al., 2022). Dentre as substâncias tóxicas do necrochorume estão as aminas biogênicas (AB) cadaverina (CAD) e putrescina (PUT), originadas pela descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, respectivamente (IOAN et al., 2017).

De acordo com Donnelly et al. (2021), foram detectadas concentrações elevadas de PUT no solo de um cemitério clandestino, em um raio de 100 m da cova onde houve o sepultamento. O estudo mostrou o potencial de migração do necrochorume no solo e ressaltou a importância da realização de análises ecotoxicológicas em ambientes cemiteriais. Idehen e Airen (2021) mostraram ainda que o necrochorume, além de contaminar o solo, contaminou o aquífero próximo do cemitério. Nesses estudos, os autores alertaram para o risco potencial desta contaminação à saúde dos habitantes do entorno do cemitério, pois a maioria deles usam água de poços como única fonte de água potável.

As AB, em concentrações endógenas, desempenham funções essenciais para a homeostase de diferentes organismos, estando envolvidas em processos biológicos naturais (BAGNI; TASSONI, 2001; RAMANI; DE BANDT; CYNOBER, 2014). Del Rio et al. (2019) reportam que concentrações exógenas de CAD e PUT causaram citotoxicidade em diferentes linhagens celulares. Para Gerner e Meyskens (2004), as AB CAD e PUT podem reagir com nitritos e formar nitrosaminas, substâncias estas que apresentam alto potencial carcinogênico. Além disso, essas aminas possuem sítios nucleofílicos, o que facilita sua ligação com ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, resultando em desestabilização dessas moléculas, o que pode conferir riscos não só ao meio ambiente, mas também à saúde pública (GONÇALVES et al., 2022).

As respostas da biota a agentes poluidores podem acontecer imediatamente após um evento de contaminação ou por respostas a uma contaminação que ocorre de forma contínua, por longo tempo no ambiente. Por esta razão, as reais consequências de um impacto ambiental, devem ser avaliadas por meio de ensaios que estimem a toxicidade aguda e crônica do agente poluidor considerado (KAPANEN; ITÄVAARA, 2001). Os ensaios ecotoxicológicos são importantes ferramentas utilizadas para qualificar e quantificar efeitos de xenobiontes em ambientes terrestres.

A espécie *Folsomia candida* (colêmbolos) é um dos bioindicadores mais utilizados e padronizados para avaliação de risco ecológico do solo (ISO 11267, 1999, MACCARI et al, 2020). Com esse organismo é possível avaliar a sobrevivência, capacidade reprodutiva e comportamento de fuga (OECD, 2009).

Os colêmbolos, por serem altamente sensíveis a alterações ambientais, vêm sendo amplamente utilizados como bioindicadores de impacto ambiental de diferentes poluentes do solo (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005; SERAFINI et al., 2020). Os testes de fuga e reprodução, realizados com colêmbolos, são cada vez mais empregados em estudos de ecotoxicidade (DOMENE et al., 2011; KWAK; AN, 2021). No entanto, são escassos os estudos ecotoxicológicos da CAD e PUT realizados com colêmbolos.

Embora haja um avanço nas pesquisas científicas envolvendo a contaminação de cemitérios, ainda é limitado o conhecimento relacionado aos subprodutos da decomposição cadavérica e os impactos ambientais ocasionados pelo necrochorume. O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade

através do teste comportamental de fuga e a toxicidade crônica (reprodução) das AB CAD e PUT, tanto de forma isolada como associadas entre si, por meio de ensaios realizados com o biomarcador *Folsomia candida*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias- teste e contaminação do solo

Foram realizados ensaios ecotoxicológicos com o bioindicador *Folsomia candida* submetidos às aminas cadaverina (1,5-Diaminopentano, fórmula molecular $NH_2(CH_2)_5NH_2$, peso molecular 102,18 g/mol, CAS: 461-94-2 – pureza ≥ 97%, Sigma) e putrescina (1,4-butanodiamina, fórmula molecular $C_4H_{12}N_2$, peso molecular 88,15 g/mol, CAS: 110-60-1 – pureza ≥ 99%, Sigma), de forma isoladas e associadas entre si, conforme descrito na Tabela 1. As concentrações usadas foram determinadas em testes preliminares de mortalidade (concentrações de 0; 1; 10; 100 e 1000 mg kg^{-1} de solo) não apresentados neste artigo.

O solo utilizado para a realização dos testes (latossolo) foi coletado no Jardim Experimental do Instituto de Biociências de Rio Claro (Universidade Estadual Paulista/UNESP) e armazenado no Laboratório de Mutagênese Ambiental deste mesmo instituto. A avaliação da capacidade máxima de retenção de água do solo (Water Holding Capacity - WHC), foi obtida de acordo com a ISO 11267 (1999), sendo estabelecido o valor de WHC de 45%. A contaminação do solo foi feita com soluções aquosas das substâncias testadas, preparada com água de osmose reversa, cujo volume acrescentado ao solo foi correspondente à quantidade necessária para atingir os 45% da retenção de água (WHC).

Nos ensaios realizados com as substâncias isoladas, o solo foi contaminado com cinco diferentes concentrações de CAD e de PUT, e nos ensaios com as associação das AB (CAD + PUT), contaminado com quatro diferentes concentrações, conforme escrito na tabela 1. Ao solo do tratamento controle foi adicionado apenas água de osmose reversa. Ambos os testes (fuga e reprodução) foram realizados em quintuplicata, com delineamento experimental inteiramente casualizado.

Tabela 1: Concentrações (em mg kg^{-1}) de cadaverina e putrescina e das associações de ambas as aminas (CAD + PUT) utilizadas nos ensaios de fuga e de reprodução realizados com *Folsomia candida*.

Identificação	Concentrações (mg kg^{-1})		
	Cadaverina	**Putrescina**	**CAD + PUT**
CN	0	0	0 + 0
C1	200	200	200 + 600
C2	400	400	600 + 1000
C3	600	600	1000 + 200
C4	800	800	1000 + 1000
C5	1000	1000	-

CN. controle negativo; C1-C5. Concentrações testadas; CAD. cadaverina; PUT. putrescina

2.2 Bioindicador

Os ensaios ecotoxicológicos realizados com as substâncias CAD e PUT foram desenvolvidos com o microartrópode *F. candida*. Os espécimes necessários para o desenvolvimento dos ensaios foram obtidos de culturas sincronizadas, cultivadas no Laboratório de Mutagênese Ambiental do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro. Os indivíduos foram mantidos em recipientes de plástico, contendo substrato constituído de uma mistura de gesso e carvão ativado (10:1 v:v). Os organismos foram acondicionados sob regime controlado de temperatura, em B.O.D à 20 ± 2 ºC, com fotoperíodo 12:12 horas claro/escuro, e alimentados com fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), duas vezes por semana (ISO 11267, 2014).

2.3 Ensaios Ecotoxicológicos

2.3.1 Comportamento de fuga em colêmbolos

O teste de fuga foi realizado de acordo com os procedimentos descritos na ISO 17512-2 (2011). Os ensaios foram desenvolvidos em recipientes plásticos (10 cm de diâmetro e 6 cm de altura), divididos ao meio por uma divisória de plástico. Em um dos compartimentos, foi adicionado 30 g de solo contaminado e no outro, a mesma quantidade de solo controle (Figura 1). Os testes controles foram montados com solo controle de ambos os lados (duplo controle). As divisórias foram retiradas, após a adição das amostras de solo em cada

compartimento e, posteriormente, 20 indivíduos (idade de 10-12 dias) foram colocados na linha central de cada réplica.

Os animais não foram alimentados durante o experimento e os recipientes usados nos ensaios foram mantidos em B.O.D à 20 ± 2 ºC com fotoperíodo de 12:12 claro/escuro por 48 horas. Após esse período, a divisória foi inserida novamente, dividindo o solo nas duas seções (contaminado e controle). Cada tipo de solo foi transferido, cuidadosamente, para outro recipiente. Foi adicionado sobre o solo água e corante azul (nanquim), para melhor visualização e contraste dos colêmbolos flutuantes. Posteriormente, foram contabilizados os indivíduos de cada tipo de solo (tratados e CN) de cada réplica. Para validação do teste, o solo controle deve apresentar valores de distribuição, dentro da faixa de 40 a 60%.

O cálculo de comportamento de fuga, foi realizado de acordo com as diretrizes da ISO 17512-2 (2011), pela equação: $x = [(n_c - n_t) / N] * 100$, onde o "x" representa a taxa de evasão dos indivíduos, o "n_c" o número de colêmbolos no solo controle, "n_t" o número de colêmbolos no solo tratado e o N o número total de indivíduos testados.

Figura 1 – Recipientes plásticos subdivididos em dois compartimentos iguais. Em um dos lados foi adicionado 30 g de solo tratado e do outro, 30 g de solo controle. Fonte: Registrado pela autora.

2.3.2 Toxicidade crônica: teste de reprodução em colêmbolos

Os procedimentos adotados nos ensaios de reprodução foram baseados na ISO 11267 (1999). Os ensaios foram conduzidos em quintuplicata, em frascos de vidro (4 cm de diâmetro e 7 cm de altura) contendo 30 g de solo contaminado

com as diferentes concentrações avaliadas (Tabela 1). Dez colêmbolos com idade entre 10-12 dias (originados de culturas sincronizadas) foram colocados nos recipientes de vidro e alimentados com 2 mg de fermento biológico. O teste controle foi realizado com solo sem contaminação. Os potes foram mantidos em B.O.D à 20 ± 2 ºC, com fotoperíodo de 12:12 claro/escuro, durante 28 dias. Os frascos foram semanalmente abertos, para a correção da umidade e permitir a troca de gases desses recipientes.

Após 14 dias do início do experimento, os recipientes foram abertos e os indivíduos novamente alimentados com 2 mg de fermento biológico. Ao final de 28 dias de exposição, o conteúdo de cada frasco foi transferido para outro recipiente, onde foi adicionado água e corante azul nanquim, como descrito no teste de fuga. O conteúdo foi misturado cuidadosamente com o auxílio de uma espátula, para melhor visualização e flutuação dos indivíduos na superfície da água. Posteriormente, as réplicas foram fotografadas e as imagens usadas para a contabilização dos colêmbolos (adultos e juvenis), pelo software ImageJ, como descrito por Alves et al (2014).

2.4 Análises Estatísticas

Para os dados de fuga e reprodução em colêmbolos, foram empregados inicialmente os testes Shapiro-Wilk e Levene, para avaliar a normalidade e homogeneidade de variância. O número de indivíduos no teste de comportamento de fuga foi analisado pelo "*Fisher Exact Test*" (*Two-tailed*), que compara o comportamento observado em relação ao comportamento esperado (ZORTÉA et al., 2016). Já para a análise de reprodução, foi comparada as médias dos tratamentos e dos controles pelo teste paramétrico ANOVA (*Analysis of Variance*), seguido do pós-teste Dunnet ($p<0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Bioensaio comportamental de fuga

Os experimentos de fuga seguiram os critérios de validação determinados pela ISO 17512-2 (2011). Após 48h de exposição, a mortalidade, para os tratamentos e controle, foi inferior a 20% e a distribuição dos indivíduos no teste

duplo controle ocorreu de maneira homogênea, permanecendo na faixa de 40 a 60%, resultado este que validou o teste.

De acordo com os dados obtidos neste estudo, os organismos expostos por 48h às diferentes concentrações de CAD ou de PUT não apresentaram comportamento de fuga, para nenhuma das concentrações avaliadas (200, 400, 600, 800 e 1000 mg kg^{-1}). Assim, os resultados foram negativos para a evitação do teste Exato de Fisher (*avoidance*). Dentre os ensaios realizados com CAD e de PUT isoladas, as concentrações C3 (600 mg kg^{-1} de CAD ou de PUT), foram as de maior preferência de permanência dos colêmbolos (Figura 2A).

Em relação ao comportamento de fuga dos colêmbolos expostos à diferentes associações de CAD e PUT, os resultados também foram negativos para o teste Exato de Fisher. Dentre as associações testadas, a C3 (1000 mg kg^{-1} de CAD + 200 mg kg^{-1} de PUT) foi a que teve a maior preferência dos indivíduos (Figura 2B).

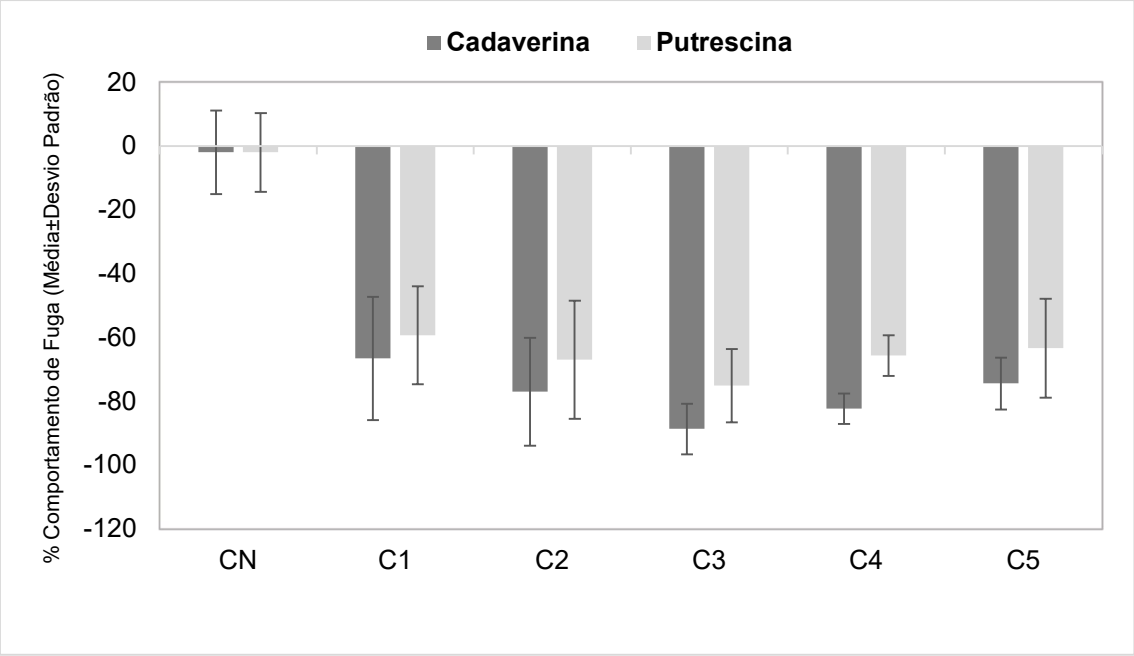


Figura 2A - Porcentagem de comportamento de fuga de colêmbolos (*F. candida*) expostos a solos contaminados com diferentes concentrações de cadaverina ou de putrescina. Concentrações apresentadas na tabela 1. Teste Exato de Fisher Bilateral (p>0,05).

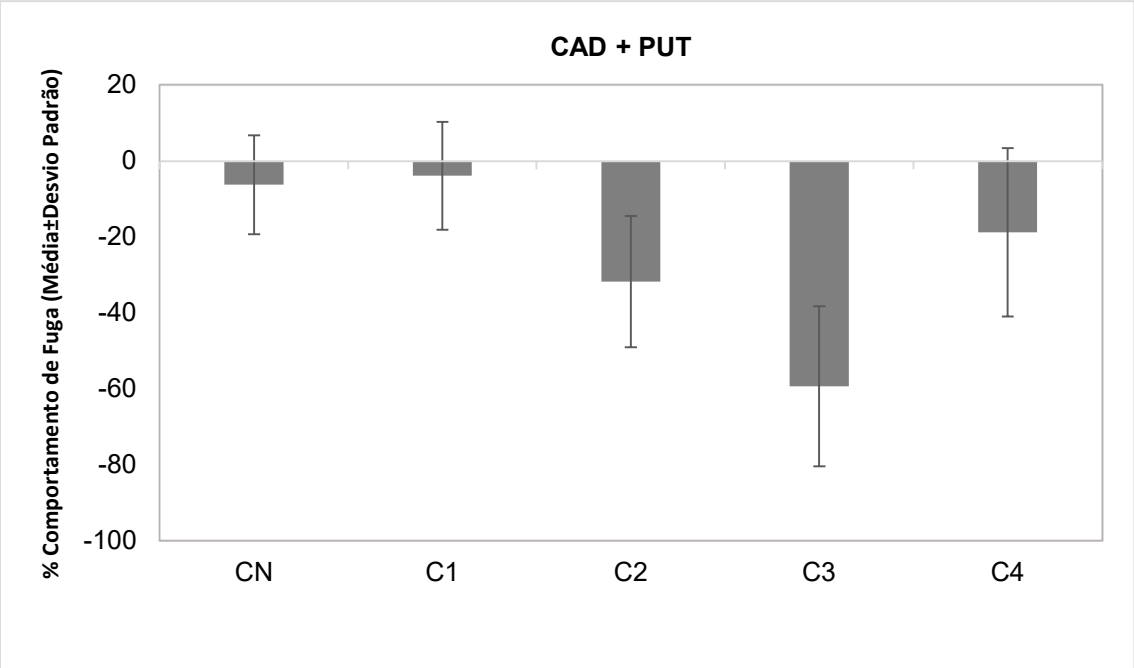


Figura 2B - Porcentagem de comportamento de fuga de colêmbolos (*F. candida*) expostos a solos contaminados com as associações de diferentes concentrações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). Concentrações apresentadas na tabela 1. Teste Exato de Fisher Bilateral (p>0,05).

3.2 Teste de reprodução em colêmbolos

Os ensaios ecotoxicológicos de reprodução seguiram os critérios de validação da norma ISO 11287 (2014). A taxa de sobrevivência dos indivíduos adultos no solo controle foi ≥ 80%, com coeficiente de variação ≤ 30%. Os valores das concentrações utilizadas nos experimentos de reprodução estão apresentados na tabela 1 e os valores de pH, aferidos no início e final do experimento para cada unidade experimental, estão expressos na tabela 2. O solo, durante os experimentos, ficou, em média, dentro faixa ideal de pH para reprodução de *F. candida* (5,5 a 6,5).

Tabela 2: Valores de pH aferidos no solo contaminado artificialmente, no início e no final do teste de reprodução realizado com as aminas biogênicas cadaverina (CAD), putrescina (PUT) e com a associação de ambas as substâncias (CAD + PUT).

TRATAMENTOS	CAD		PUT		CAD + PUT	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
CN	5.92	5.93	4.55	4.82	4.87	6.03
C1	5.76	4.84	5.18	5.61	6.12	6.48
C2	5.06	5.15	5.68	5.55	6.51	6.96
C3	5.25	5.47	5.38	5.69	6.4	6.77
C4	5.57	5.63	6.11	5.87	5.9	6.1
C5	5.95	5.99	6.23	5.77	-	-
Média	**5.59**	**5.50**	**5.52**	**5.55**	**5.96**	**6.47**

CN. Controle negativo; C1-C5. diferentes concentrações das aminas biogênicas cadaverina e putrescina; CAD. Cadaverina; PUT. Putrescina. Concentrações apresentadas na tabela 1.

Na avaliação da toxicidade crônica de colêmbolos expostos a CAD e PUT, individualmente, apenas a concentração C1 (200 mg kg^{-1}) de CAD apresentou redução significativa ($p<0,05$), de 81% do número de juvenis, quando comparado ao CN. Com relação aos resultados obtidos com PUT, nenhuma das concentrações analisadas apresentou diferenças significativas em relação ao solo controle (Figura 3A).

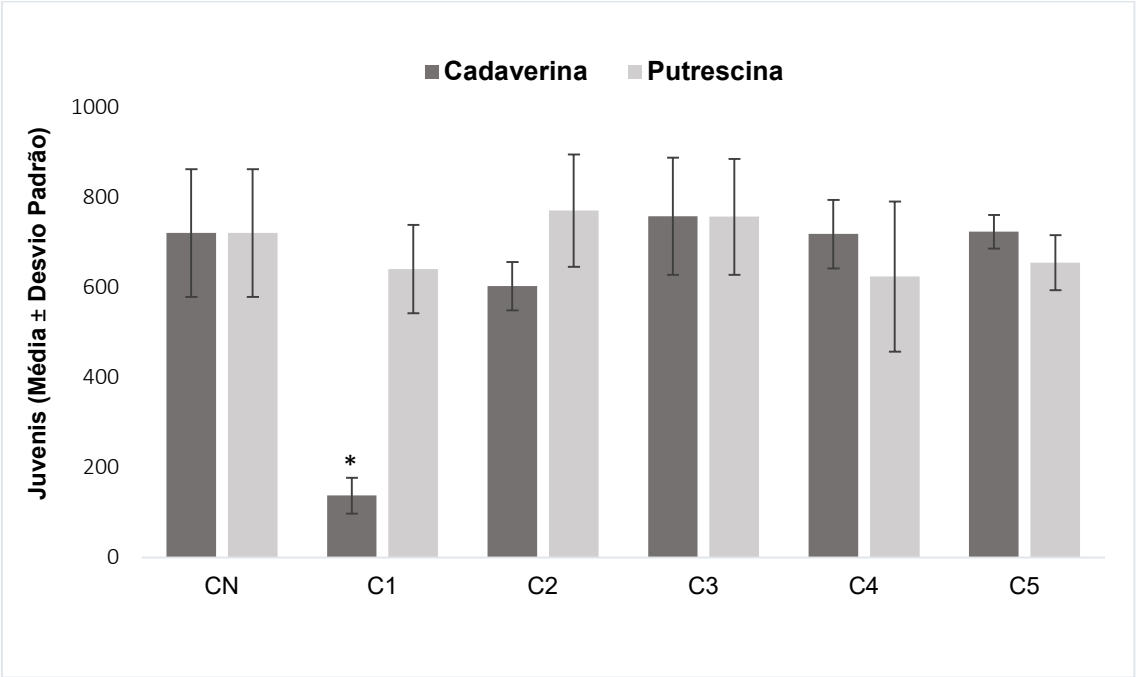


Figura 3A - Média de juvenis observados no teste de reprodução de colêmbolos (*Folsomia candida*) expostos por 28 dias a solos contaminados com diferentes concentrações de cadaverina e putrescina individualmente. Concentrações apresentadas na tabela 1. (*) indica redução significativa no número de juvenis, comparado ao solo controle pelo teste ANOVA/Dunnett ($p<0,05$).

No que se refere aos resultados das AB associadas, três das quatro concentrações avaliadas (C2, C3 e C4) diminuíram estatisticamente o número médio de juvenis, após 28 dias de exposição. A concentração C4 (1000 mg kg^{-1} de CAD + 1000 mg kg^{-1} de PUT), concentração mais elevada dentre as testadas, induziu redução em >86% do número de juvenis, quando comparado ao CN. As concentrações C2 e C3 reduziram o número médio de juvenis em 67% e 84%, respectivamente (Figura 3B).

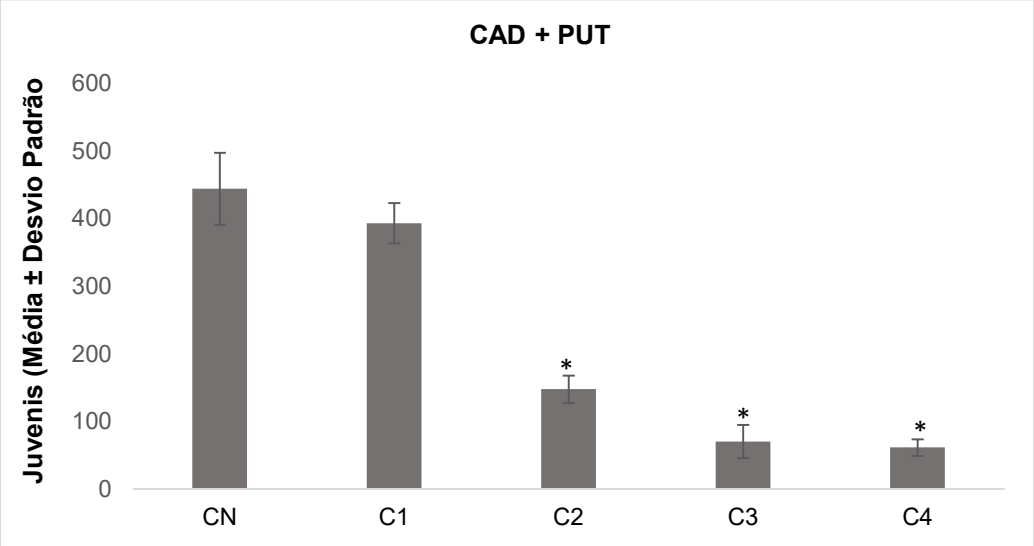


Figura 3B - Média de juvenis do teste de reprodução com colêmbolos expostos por 28 dias em solos contaminados com diferentes associações de cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). Concentrações apresentadas na tabela 1. (*) indica redução significativa no número de juvenis, comparado ao solo controle (CN). ANOVA/Dunnett (p<0,05).

4. DISCUSSÃO

O comportamento de fuga é uma ferramenta muito utilizada em avaliações de solos contaminados. Por este teste, é avaliado o comportamento de repulsão de organismos endêmicos de solos, em resposta às condições desfavoráveis dos mesmos (MATOS-MOREIRA et al., 2011; NATAL-DA-LUZ; RÖMBKE; SOUSA, 2008). A disponibilidade de matéria orgânica, assim como a textura física do solo podem influenciar o comportamento de fuga de organismos edáficos (MERRITT et al.,2007; NATAL-DA-LUZ; RÖMBKE; SOUSA, 2008; SERAFINI et al., 2020). De acordo com Heo et al (2019), a matéria orgânica liberada nos processos de decomposição cadavérica podem criar ilhas localizadas de matéria orgânica importantes para a fertilidade do solo, mas que

também podem influenciar na estrutura da comunidade de invertebrados do local.

A diversidade de colêmbolos edáficos está relacionada com o tipo de solo e com suas características físicas e químicas. Os colêmbolos desempenham importante função detritívora, o que contribui para a decomposição da matéria orgânica (BERUDE et al, 2015).

No presente estudo, foi observado que os colêmbolos preferiram os solos contaminados com CAD e PUT. A preferência dos organismos pelos solos contaminados com as AB pode estar associada à disponibilidade de matéria orgânica derivada da putrefação, que serve de fonte energética para esses organismos. Resultados semelhantes de comportamento de fuga negativa foram observados por Matos-Moreira et al. (2011), quando expuseram colêmbolos (*F. candida*) à chorume bovino. Esses autores também correlacionaram este comportamento com as propriedades específicas do solo, como a disponibilidade de matéria orgânica e a textura dos mesmos.

Estudos de Cravo (2015) mostram alta predominância de colêmbolos nos solos onde ocorre putrefação de suínos, sobretudo na fase de liquefação. Singh et al. (2018) também observaram a presença desses organismos em amostras de solos coletados sob cadáveres humanos em processo de putrefação. Por esses estudos citados, é possível afirmar que existe uma atração destes organismos pelos subprodutos gerados no processo de decomposição. Contudo, é importante atentar que as exposições curtas a material tóxico podem mascarar efeito tóxicos de longo prazo, como sobrevivência e reprodução, tanto para essa espécie, como para outros biomarcadores (SERAFINI et al., 2020).

No presente estudo, também foi observado alteração na reprodução dos colêmbolos expostos às associações de CAD e PUT. Por este resultado, é possível inferir que, embora a toxicidade individual das aminas tenha sido baixa, quando associadas entre si (CAD + PUT), o composto formado exibe efeito tóxico potencializado. Resultados de diferentes estudos (DEL RIO et al., 2017, 2019; RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005) mostram aumento de efeitos tóxico, por sinergia, quando essas AB se associam com diferentes substâncias tóxicas.

De acordo com Sasaki et al. (2021), as AB são substâncias-chave da modulação da fisiologia reprodutiva e do comportamento social. Til et al. (1997)

avaliaram a toxicidade aguda e subaguda de cinco AB, dentre elas CAD e PUT, após seis semanas de exposição de ratos Wistar a essas aminas. Os autores relataram, dentre outras alterações, a diminuição testicular, redução da espermatogênese e baixa fecundidade. Também foi investigada por Wieczorek; Świątek; Durak (2021) a influência da triptamina, tiramina, cadaverina e putrescina em uma espécie de pulgão (*Cinara cupressi*). Os resultados obtidos para CAD e PUT foram similares aos do presente estudo, pois os autores observaram redução significativa (>50%) de embriões em desenvolvimento, sendo ainda mais severos naqueles tratados com CAD.

A redução da população de colêmbolos acarreta em perdas de atividades ecossistêmicas, como a ciclagem de nutrientes, manutenção da estrutura do solo e controle biológico (BERNARDINO et al., 2021). Diante do exposto, torna-se cada vez mais necessária a implementação de estudos ecotoxicológicos, que permitam avaliar, de maneira mais efetiva, os possíveis impactos ambientais e os riscos à saúde humana, relacionadas a contaminantes de ambientes cemiteriais. O presente estudo traz informações inéditas sobre a toxicidade de contaminantes derivados de decomposição cadavérica, comuns de ambientes de cemitérios, para a biota edáfica.

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos é possível inferir que colêmbolos da espécie *F. candida* são bons bioindicadores de qualidade do solo. A espécie se mostrou sensível e um excelente organismo-modelo a ser usado em ensaios ecotoxicológicos, como os empregados neste estudo. Os ensaios de fuga demonstraram que os colêmbolos não apresentaram comportamento de fuga, quando expostos a solos contaminados com CAD ou com PUT. Os ensaios ainda mostraram que os organismos testes migraram para o solo tratado com as aminas. Essa preferência provavelmente esteja relacionada à utilização destas AB como fonte de alimento para os colêmbolos. Essa afirmação tem como suporte estudos de biologia forense frequentemente que citam a participação de colêmbolos no processo de decomposição cadavérica.

Já a exposição crônica afetou as atividades reprodutivas dos colêmbolos. Foi observada uma interação sinérgica da associação de CAD e PUT, que potencializou o seu efeito negativo sobre a reprodução. Alterações na

reprodução desses organismos edáficos, podem levar a diminuição da população de colêmbolos, fato este que pode desencadear uma série de desequilíbrios relacionados às suas funções ecossistêmicas do solo.

Por fim, estes resultados alertam para o potencial de contaminação ambiental e efeito tóxico das AB CAD e PUT, bem como reforçam a necessidade de estudos ecotoxicológicos, para avaliar impactos derivados de contaminação proveniente de cemitérios.

Referências

ALVES, P. R. L. et al. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 105, n. 1, p. 65–71, 2014.

BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. **Amino Acids**, v. 20, n. 3, p. 301–317, 2001.

BERUDE, M.C.; GALOTE, J.K.B.; PINTO, P.H.; DO AMARAL, A.A. A mesofauna do solo e sua importância como bioindicadora. **Enciclopédia biosfera Goiânia**, v.11, n. 22, p. 14-28, 2015.

BERNARDINO, M. M. et al. Ecotoxicity of imidacloprid to soil invertebrates in two tropical soils with contrasting texture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 22, p. 27655–27665, 2021.

CETESB. **Qualidade do solo** (https://cetesb.sp.gov.br/solo/poluicao/. Acesso em 23/01/2023.

CRAVO, L. A. S. Estudo experimental sobre decomposição cadavérica usando carcaças de *Sus scrofa domestica*. p. 160, 2015.

DEL RIO, B. et al. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. **Food Chemistry**, v. 218, p. 249–255, 2017.

DEL RIO, B. et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

DENT, B. B.; FORBES, S. L.; STUART, B. H. Review of human decomposition processes in soil. **Environmental Geology**, v. 45, n. 4, p. 576–585, 2004.

DOMENE, X. et al. Influence of soil properties on the performance of Folsomia candida: Implications for its use in soil ecotoxicology testing. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1497–1505, 2011.

DONNELLY, L. J. et al. Analysis of soil following a police-led open area search and the recovery of a cold-case homicide grave. **Geological Society Special Publication**, v. 492, n. 1, p. 65–86, 2021.

FOUNTAIN, M. T.; HOPKIN, S. P. Folsomia candida (Collembola): A “standard” soil arthropod. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 201–222, 2005.

GAN, Y. et al. Source quantification and potential risk of mercury, cadmium, arsenic, lead, and chromium in farmland soils of Yellow River Delta. **Journal of Cleaner Production**, v. 221, p. 98–107, 2019.

GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 10, p. 781–792, 2004.

GÓMEZ, F. G. et al. Proposal of an Initial Environmental Management and Land Use for Critical Cemeteries in Central Ecuador. **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 3, 2022.

GONÇALVES, L. R. et al. Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic—the environmental impact. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 2, p. 1696–1711, 2022.

HEO, C. C. et al. Soil arthropod community responses to carrion with delayed insect access. **Food Webs**, v. 20, p. e00118, 2019.

IDEHEN, O.; AIREN, O. **Joint Geophysical Methods and Hydro Physicochemical Analyses for Environmental and Criminal Geoforensics Investigations of Leachate Plume Migration in Third Cemetery, Edo State, Nigeria**. , 2021. Disponível em: <http://creativecommons.>

IOAN, B. G. et al. The chemistry decomposition in human corpses. **Revista de Chimie**, v. 68, n. 6, p. 1450–1454, 2017.

ISO-International Organization for Standardization. (ISO 11267:1999) Soil quality: **Inhibition of reproduction of Collembola (Folsomia candida) by soil pollutants**. ISO, Geneva (ISO 11267), 1999.

ISO 11267:2014. Soil quality — **Inhibition of reproduction of Collembola (Folsomia candida) by soil contaminants**. ISO - International Standardization Organization, 2014. 19 p.

ISO-International Organization for Standardization. (ISO 17512-2:2011) Soil Quality: **Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behavior**. Part 2: Test With Collembolans (Folsomia candida). ISO, Geneva (ISO 17512 2), 2011.

KAPANEN, A.; ITAVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Finland, v. 49, p.1-16, 2001.

KWAK, J. IL; AN, Y. J. Post COVID-19 pandemic: Biofragmentation and soil ecotoxicological effects of microplastics derived from face masks. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, n. March, p. 126169, 2021.

MACCARI, A.P.; BARETTA, D.; PAIANO, D.; LESTON, S. FREITAS, A.; RAMOS, F.; SOUSA, J.P.; KLAUBERG FILHO, O. Ecotoxicological effects of pig manure on Folsomia candida in subtropical Brazilian soils. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdan, v. 314, p. 113-120, 2016.

MACCARI, A.P.; SEGAT, J.C.; TESTA, M.; BARETTA, C.R.D.M.; BARRETA, D. The effect composted and non-composted poultry litter on survival and reproduction of Folsomia candida. **International Journal of Recycling of Organic Waster in Agriculture**, v. 9, p. 99-105, 2020.

MATOS-MOREIRA, M. et al. Behavioral avoidance tests to evaluate effects of cattle slurry and dairy sludge application to soil[1]. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 4, p. 1471–1477, 2011.

MERRITT, R. W. et al. Collembola of the grave: A cold case history involving arthropods 28 years after death. **Journal of Forensic Sciences**, v. 52, n. 6, p. 1359–1361, 2007.

NATAL-DA-LUZ, T.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J. P. Avoidance tests in site-specific risk assessment - Influence of soil properties on the avoidance response of Collembola and earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 1112–1117, 2008.

NECKEL, A. et al. Hazardous elements in the soil of urban cemeteries; constructive solutions aimed at sustainability. **Chemosphere**, v. 262, 2021.

OECD/OCDE - The organisation for economic co-operation and development. Collembolan

reproduction test in soil. 2009.

RAMANI, D.; DE BANDT, J. P.; CYNOBER, L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 14–22, 2014.

RUIZ-CAPILLAS, C.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Biogenic amines in meat and meat products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 7–8, p. 489–599, 2005.

SASAKI, K. et al. Social Evolution With Decoupling of Multiple Roles of Biogenic Amines Into Different Phenotypes in Hymenoptera. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, n. May, p. 1–12, 2021.

SERAFINI, S. et al. Different diets with and without inclusion of antimicrobial additives alter the toxicity of swine manure to springtails and earthworms? **Bioscience Journal**, v. 36, n. 3, p. 976–991, 2020.

SINGH, B. et al. Temporal and spatial impact of human cadaver decomposition on soil bacterial and arthropod community structure and function. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–12, 2018.

TIL, H. P. et al. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 3–4, p. 337–348, 1997.

WIECZOREK, K.; ŚWIĄTEK, P.; DURAK, R. Influence of selected biogenic amines on development and demographic parameters of a temperate population of Cinara (Cupressobium) cupressi (Hemiptera, Aphididae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 15, n. 4, p. 583–593, 2021.

ZORTÉA, T. et al. Comportamento De Fuga De Colêmbolos Expostos a Solos Contaminados Com Cipermetrina. **Scientia Agraria**, v. 16, n. 4, 2016.

Artigo 3

Toxicity assessment of the biogenic amines cadaverine and putrescine in aquatic organisms

Ana Paula Andrade Braga[11], José Henrique Vallim[2], Rodrigo Fernandes Castanha[2], Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro[2], Maria Aparecida Marin-Morales[1]

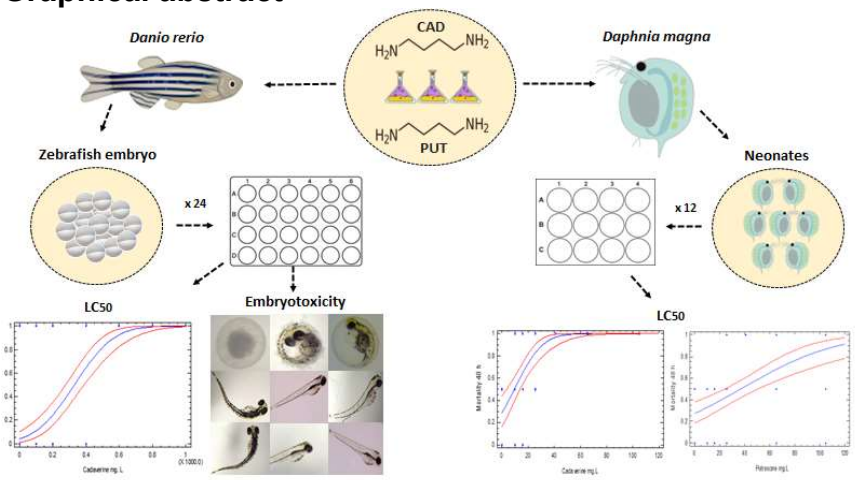
[1]Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Av. 24-A, 1515, P.O Box 178, Rio Claro, São Paulo State 13506-900, Brazil
[2]Laboratory of Ecotoxicology and Biosafety, Embrapa Environment, Highway SP-340, km 127.5, Jaguariúna, São Paulo State 13918-110, Brazil

Abstract:

Cemeteries are among the most polluting sources of groundwater and surface water in the world. Necro-leachate, a liquid released during the putrefaction of corpses, is the main culprit of such pollution. Among the compounds in this liquid are the potentially toxic amines cadaverine and putrescine, which are still poorly understood in terms of the environmental health risks they pose. This study evaluated the acute toxicity of cadaverine and putrescine, using efficient contamination bioindicators of aquatic environments. *Danio rerio* and *Daphnia magna* were exposed to both amines individually or in a mixture. Acute toxicity (LC_{50}) was then observed in both organisms after exposure to the amines individually. Cadaverine showed higher lethality for *D. magna* (LC_{50} – 9.5 mg. L^{-1}) and *D. rerio* (LC_{50} - 335.5 mg. L^{-1}) than did putrescine (LC_{50} - 36.7 mg. L^{-1} and LC_{50}- 452.6 mg. L^{-1}, respectively). In embryotoxicity tests with *D. rerio* (hatching rate and malformations), delayed hatching, vertebral column malformations, and pericardial edema were observed after exposure to an amine mixture. However, co-exposure to cadaverine and putrescine was not toxic to *D. magna*. The results of this study confirmed the efficiency of the bioindicators used to assess contaminants in cemeteries and raised awareness of the toxic potential of cadaveric decomposition by-products.

Keywords: Cemetery contamination, aquatic toxicology, *Danio rerio*, *Daphnia magna*, environmental risk assessment

Graphical abstract



[1]Corresponding author: apandradebraga@gmail.com

1. INTRODUCTION

One of the socio-environmental problems that most concern the world today is water pollution. The waste generated by a range of human actions contributes to this problem, waste that is currently considered the primary source of this contamination (Afangideh and Udokpoh, 2022).

Within the last decade, the burial of bodies in cemeteries has aroused the interest of scientists, due to its polluting potential (Gonçalves et al., 2022). According to Batista et al (2022), better planning is necessary regarding burial practices due to the risk of groundwater pollution from this type of activity. The risks pertaining to this type of pollution must be evaluated, as the degree of understanding with regard to the polluting loads of cemeteries remains insufficient (Franco et al., 2022). Studies carried out in several countries have found soil and groundwater around cemeteries contaminated with necro-leachate (Afangideh and Udokpoh, 2022; Idehen, 2020; Netto et al., 2021; Oliveira et al., 2022; Rodrigues and Pacheco, 2003). These studies point to the need for better monitoring of cemetery areas and to assess, in detail, the toxic effects of by-products coming from cadaveric decomposition (Batista et al., 2022). Contamination from cemeteries has also been identified as a cause for concern by the World Health Organization (WHO) and the National Council for the Environment (CONAMA-Brazil), due to its impacts on the biological environment, soil, groundwater, and human health (Viegas et al., 2022).

Most necropolises were built without prior studies assessing the impacts on the environment and the local community (Neckel et al., 2021). According to Gonçalves et al. (2022), the increasing number of burials, especially during the SarsCov-2 pandemic, led to a worsening of the pollution scenario and to an alert about the potential ecotoxicological risks derived from the presence of necro-leachate in cemeteries (Gonçalves et al., 2022).

Cadaveric decomposition is the most relevant activity relating to the contamination of cemetery environments (Idehen and Ezenwa, 2019; Zychowski and Bryndal, 2015). During the decomposition of bodies, in addition to gases, a liquid called necro-leachate is generated (Batista et al., 2022). Necro-leachate is composed of water, mineral salts and organic substances, including the biogenic amines (BAs) cadaverine (CAD) and putrescine (PUT); these substances are considered toxic and responsible for the fetid odors that can be found in bodily

fluids (Crisanto-Perrazo et al., 2022). Gómez et al (2022) mention that the adult cadaver releases about 0.4–0.6 L/kg in body weight of necro-leachate. The authors also warn that the physical-chemical conditions of the soil can facilitate the percolation of this liquid and the subsequent contamination of the water table. The necro-leachate may also carry within it microbiological agents and chemical compounds used in life by the body (Afangideh and Udokpoh, 2022); in addition to this, substances used in the embalming process and in the construction of coffins are also released, both potentially raising the level of contamination in cemeteries (Silva et al., 2020).

CAD and PUT are by-products naturally synthesized in living organisms by the decarboxylation of amino acids. CAD ($C_5H_{14}N_2$) is a by-product of the amino acid lysine, and PUT ($C_4H_{12}N_2$), of ornithine (Franco et al., 2022; Gonçalves et al., 2022). In endogenous concentrations, these amines participate in important physiological processes, such as the synthesis of proteins, hormones, and nucleic acids. CAD and PUT are also related to cell proliferation and the maintenance of blood pressure and body temperature (Abuhlega and Ali, 2022). In addition, BAs influence membrane stability, in addition to acting as neurotransmitters.

However, when found in high concentrations, they can be toxic to different organisms, and pose a potential risk to the environment and public health (Dasa et al., 2022; Wójcik et al., 2020). The toxic level of BAs is difficult to determine, due to their specific characteristics, as well as their concomitant presence with other amines. However, a maximum allowable level of total BAs has been suggested at 750–900 mg/kg body weight (Abuhlega and Ali, 2022).

The zebrafish (*Danio rerio*) has been used in several ecotoxicological studies. The species emerged as a vertebrate model in the investigation of changes in embryonic development and the genotoxic, mutagenic and carcinogenic potential of aquatic contaminants (Anifowoshe et al., 2022). The main advantages of this model include its short life cycle, rapid reproductive maturity, extrauterine development, high egg production and transparent embryos, which permits easy phenotypic observation (Lee et al., 2022). Furthermore, according to Howe et al (2013), the species' genetic makeup is 70% orthologous with that of human beings.

The planktonic water flea, *Daphnia magna*, is also an important bioindicator of freshwater toxicity, mainly due to its sensitivity to pollutants, genetic stability, and representativeness in the food chain. In addition, it allows the assessment of the acute and chronic effects of different chemical substances (Belaid and Sbartai, 2021). *D. magna* are able to filter large amounts of water and suspended particles, thus allowing a greater potential to be affected by the ingestion of xenobiotics when compared to other aquatic organisms (Lovern and Hart, 2022).

Considering that the environmental impacts caused by necro-leachate are still poorly understood, the objective of this study was to evaluate the effects of the acute toxicity of BAs CAD and PUT, isolated, or associated with each other. The ecotoxicological study was carried out with two important bioindicators of environmental quality (*D. rerio* and *D. magna*); the LC_{50} in aquatic bioindicators and embryotoxicity in the fish was also evaluated. The results of this study have expanded our understanding with regard to BAs originating from cadaveric putrefaction, data that may serve to assist both in the elaboration of better norms for monitoring the effects of cemetery contaminants, as well as in the decision making of environmental agencies, regarding the regulation of installations and licensing of new cemeteries.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemical substances evaluated

The BAs cadaverine (1,5-Diaminopentane, molecular formula $NH_2(CH_2)_5NH_2$, molecular weight 102.18 g/mol, CAS: 461-94-2 – purity ≥ 97%, Sigma Aldrich®) and putrescine (1,4-Butanediamine, molecular formula $C_4H_{12}N_2$, molecular weight 88.15 g/mol, CAS: 110-60-1 – purity ≥ 99%, Sigma Aldrich®) were evaluated individually and associated with each other.

2.2 Maintenance of the bioindicators

2.2.1 Danio rerio

Breeding-stage *D. rerio* (wild-type line) were kept under laboratory conditions appropriate to conductivity (400 ± 0.2 µS), temperature (28 ºC ± 0.2), and pH (7.0 ± 0.2) (Rack Hydrus, ZEB-40, Alesco®). Conductivity was maintained

using Red Sea Salt®, and the pH controlled using Acid Buffer™ and Alkaline Buffer™ (Seachem® buffers). The zebrafish embryos were maintained in reconstituted water prepared according to the USEPA (2002). The procedures used in this study were approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA), from Embrapa Environment (CEUA-Embrapa Meio Ambiente, protocol nº 002/2022).

2.2.2 Daphnia magna

Individuals of the species *D. magna* were cultivated in aquariums measuring 40 x 25 x 15 cm, containing water reconstituted with nutrients prepared according to USEPA (2002). The reconstituted water in the aquariums was changed twice a week. The organisms were kept in an acclimatized room under a controlled temperature (20 ± 2º C) and fed daily with algae of the species *Raphidocelis subcapitata*.

2.3 Toxicity assays

2.3.1 Danio rerio: LC_{50} and embryos (FET test)

Preliminary tests were performed to determine the average lethal concentration for 50% of the exposed organisms (LC_{50} – mg. L^{-1}). The concentrations used to obtain the LC_{50} of CAD and PUT were 200, 400, 600, 800, and 1000 mg. L^{-1}. The bioassays with a BAs mixture were performed using the concentrations in Table 1.

The FET test was performed with four different combinations of these CAD and PUT amines. In this assay, 3-hour post-fertilization (hpf) embryos were exposed to the mixtures for 96 hours, according to OECD protocol 236 (2013). A negative control was carried out with the embryo medium (35 mg of $NaHCO_3$; 60 mg of $MgSO_4$; 4 mg of KCl; 60 mg of $CaSO_4 2H_2O$, in a final volume of 1L of water), and a positive control was performed with dichloroaniline (3,5-Dichloroaniline ≥98%, Sigma Aldrich®, D55792).

Exposure was performed in 24-well polystyrene plates (*n* = 24 organisms per treatment). Embryos were individually maintained in 2 mL of test solution, under a 14/10h light/dark cycle at 26 ± 0.2 ºC in a B.O.D incubator. Embryos and larvae were evaluated and photographed every 24h using a stereomicroscope (Model SMZ 2 LED, software Optika View Version 7.1.1.5, Optika®), to determine

the occurrence of lethality and malformations (spine, tail, pigmentation, edema, formation of somites, absorption of the yolk sac, and heartbeat). The hatching rate was calculated as the relation between the successful hatching of embryos and the total number of embryos in each replica.

Table 1. Cadaverine (CAD) and putrescine (PUT) concentrations (LC_{50} mg. L^{-1}) used in the toxicity evaluations of mixtures of these biogenic amines for *Danio rerio* and *Daphnia magna*.

CAD and PUT Association	Concentrations mg. L^{-1}
	CAD and PUT, respectively
M1	1/10 LC_{50} + 1/10 LC_{50}
M2	LC_{50} + 1/10 LC_{50}
M3	1/10 LC_{50} + LC_{50}
M4	LC_{50} + LC_{50}

CAD: cadaverine, PUT: putrescine; M1. CAD and PUT association 1 tested; M2. CAD and PUT association 2 tested; M3. CAD and PUT association 3 tested; and M4. CAD and PUT association 4 tested, LC_{50}. Lethal concentration at 50%.

2.3.2 Daphnia magna acute toxicity test

D. magna neonates, which were younger than 24h old, were exposed for 48h to the following treatments: control (only reconstituted water), CAD, PUT and a mixture of both substances (CAD + PUT). Preliminary tests (0; 0.1; 1; 10 and 100 mg. L^{-1}) were performed to determine the mean lethal concentration for 50% of the individuals (LC_{50} – mg. L^{-1}). After the preliminary tests, the following concentrations were those definitive to obtain the LC_{50}: 10; 16; 25.6; 40.96; 65.54; 104.86 mg. L^{-1}, respectively C1 up to C6. The concentrations for the BAs mixtures are shown in Table 1.

Organisms were distributed on 12 polystyrene well plates in a total volume of 5 mL of test solution per well. For each treatment, the study used one plate, each containing two organisms, thus totaling 24 replicates per treatment. After a period of 24 and 48 h of exposure, the organisms were evaluated and compared to the control group with regard to their immobility.

2.4 Statistical analysis

To determine the average lethal concentration (LC_{50}) of CAD and PUT, as well as their confidence intervals (95%), the “Probit Analysis” method was used. Data were evaluated using Statgraphics Centurion XVII software, Version 1.17.04 (Stat Point Technologies 2014). The data obtained from the BA mixture were evaluated using the STATISTICA 7.0 program for the analysis of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variance (Levene). For the analysis of means comparison between treatments and control, this study used the GraphPad Prism 5.0 software. Data were submitted to the parametric ANOVA (Analysis of Variance) test, followed by the Dunnet post-test ($p<0.05$).

3. RESULTS

3.1 Acute toxicity bioassays with zebrafish embryos

3.1.1 Lethal concentration (LC_{50}) calculation

The lethality of embryos exposed to the BAs CAD or PUT was determined by the clotting of the embryo or by the absence of heartbeats. Data from negative and positive controls validated all the tests performed (OECD, 2013). The observed lethality after 24h of exposure was < 10% for the control group and 100% for the positive control.

The obtained results showed that the lethality rate was directly proportional to the increase in CAD concentration. All tested concentrations induced lethality in zebrafish embryos. After 96h of exposure, the lowest concentration tested (200 mg. L^{-1}) induced 21% lethality, while the highest (1000 mg. L^{-1}) induced 100% lethality. From these results, the average lethal concentration (LC_{50} - 96h) of CAD was calculated (Figure 1A), the value of which was 329.65 mg. L^{-1}.

Embryos exposed to putrescine presented lethality for all tested concentrations, with dose-response–dependent characteristics. After 96h of exposure, the concentration of 200 mg. L^{-1} caused 8% embryo lethality. The highest concentrations tested (C3 – 600 mg. L^{-1}; and C4 – 800 mg. L^{-1}), showed a lethality of 25% and 100%, respectively. The LC_{50} of PUT (96h exposure) was of 449.56 mg. L^{-1} (Figure 1B).

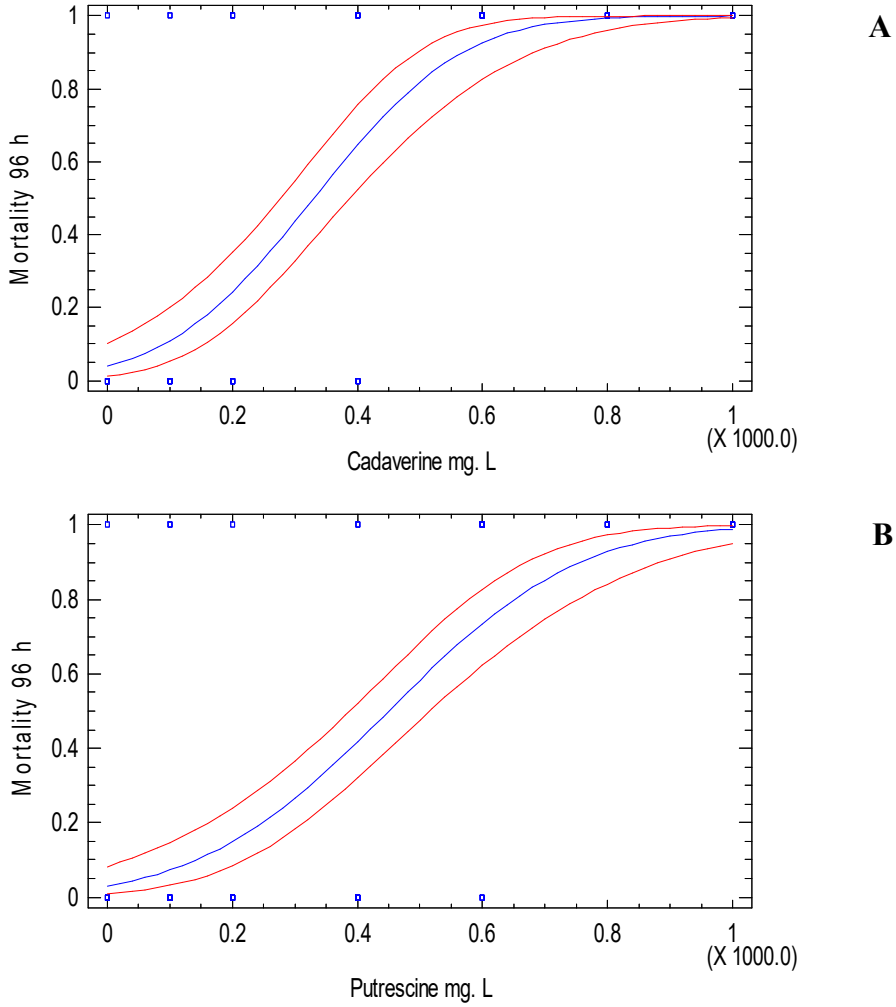


Figure 1. A) Regression analysis for the calculation of cadaverine LC_{50}. **B**) Regression analysis for the LC_{50} calculation of putrescine. Statistical test determined by the "Probit Analysis" module.

Table 2. Mean lethal concentration $LC_{50\text{-}10}$ (mg. L^{-1}) to different concentrations of CAD and PUT after 96h; 95% confidence interval (n = 24/concentration). Statistical test determined by the "Probit Analysis" module.

$LC_{50\text{-}10}$ 96 h (mg. L^{-1})	**CAD**	**PUT**
LC_{50}	329.65	449.56
LC_{40}	282.36	388.81
LC_{30}	231.76	323.81
LC_{20}	172.54	247.74
LC_{10}	90.42	142.25

$LC_{50\text{-}10}$. Lethal concentration for 50-10% of individuals tested; CAD: cadaverine; PUT: putrescine.

The increase in lethality was significant in all treatments with embryos exposed to CAD and PUT concomitantly (Figure 2). Effects were observed within the first 24h of exposure. Treatment M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT) increased the lethality of individuals by 50% when compared to that of the control group. The highest concentration (M4), equivalent to LC_{50} CAD + LC_{50} PUT, showed a 96% lethality for embryos. According to the results observed for M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT) and M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD), it may be inferred that cadaverine was more toxic than putrescine.

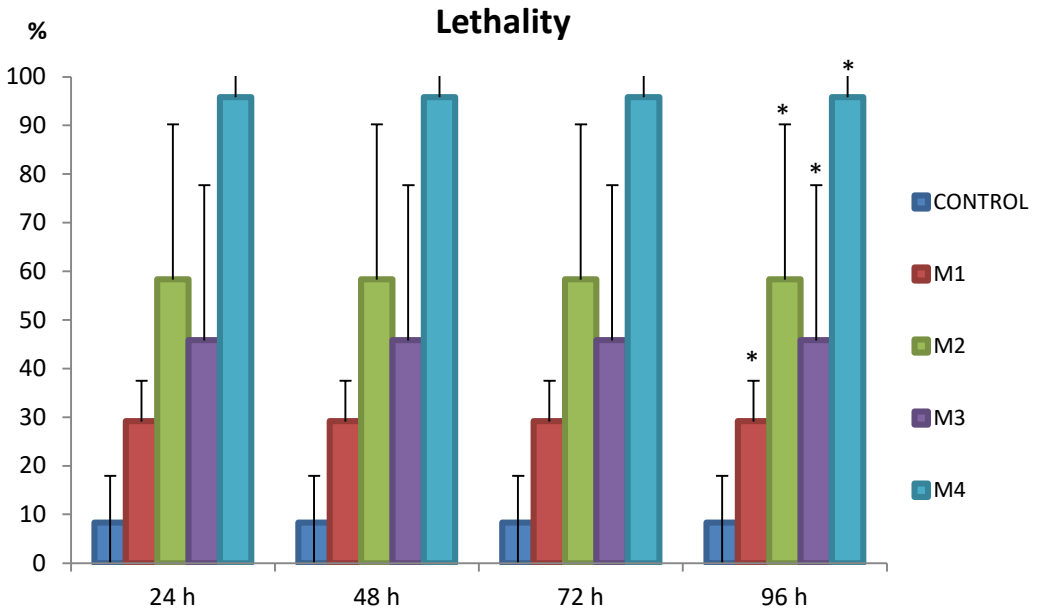


Figure 2. Lethality rate of zebrafish embryos exposed to cadaverine and putrescine mixture. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (LC_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett (* $p<0.05$).

3.1.2 Hatching delay and malformations

Table 3 displays data on the embryonic development stages (24–96 hpf) of the zebrafish. The control group organisms started hatching at 72 hpf. At the end of the 96-h exposure, the hatching rate of the control group was greater than 90%.

The different concentrations of CAD or PUT evaluated in this study did not induce changes in the hatching parameters of zebrafish eggs, when compared to those of the control group. However, every mixture of CAD and PUT caused morphological changes and a decrease in the egg hatching rate, except for M4, which had such a high lethality rate (>90%) that it prevented the evaluation of these parameters (Figure 3, 4, 5, 6).

All CAD + PUT mixtures evaluated in this study led to the delayed hatching of *D. rerio* eggs. The embryonic development stages (24–96 hpf) and zebrafish hatching delay images are shown in Figure 3. Treatment M1, referring to the combination of lower concentrations (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT) had less influence on this reduction in the hatching rate by 10%, when compared to the control group. On the other hand, the treatment that showed the greatest toxicity was a combination of the highest concentration of CAD with the lowest concentration of PUT (M2 - LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT). This treatment reduced the hatching of embryos by 55% after 96h of exposure (Figure 4).

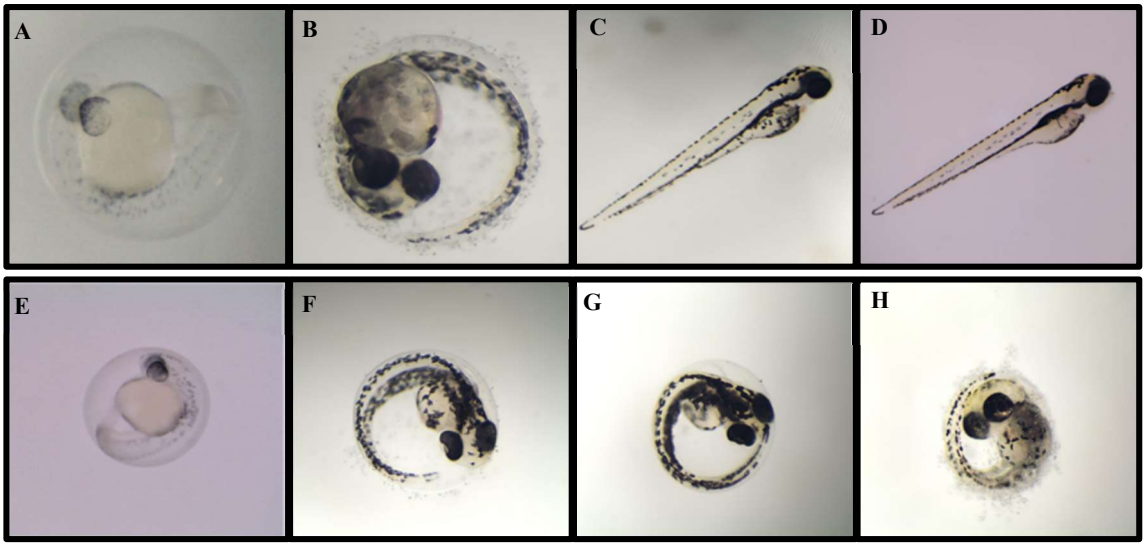


Figure 3. Embryonic development at different stages of zebrafish development (24 to 96 hpf). A-D: Standard development (control) to 24, 48, 72, and 96 hpf, respectively. E-H: Developmental delay observed in zebrafish embryos exposed to the mixture of CAD and PUT at 24 (E), 48 (F), 72 (G), and 96 hpf (H). Source: Prepared by the author.

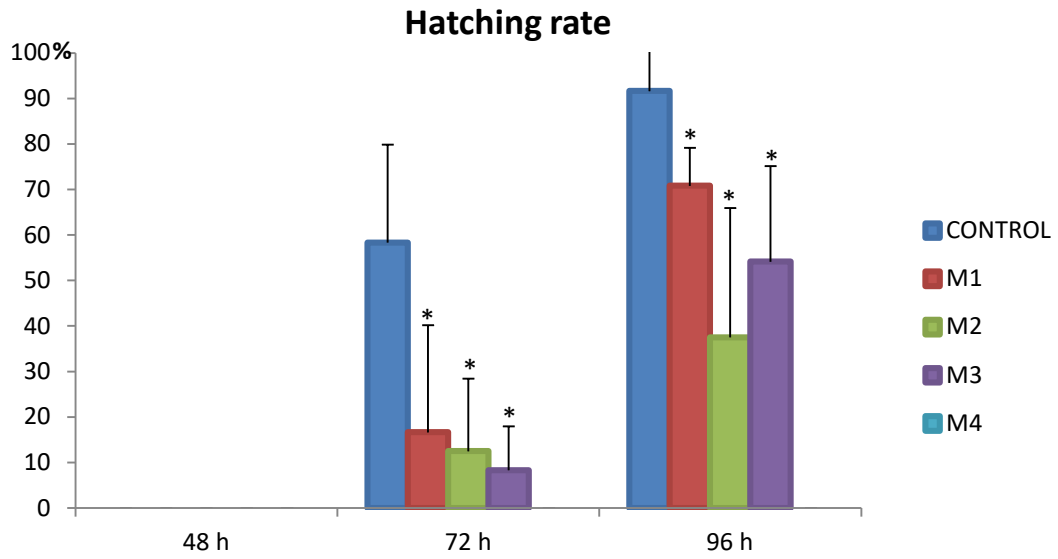


Figure 4. Hatching rate of zebrafish embryos exposed to a cadaverine and putrescine mixture. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (CL_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett (* $p<0.05$).

The control group did not show significant morphological changes in any of the bioassays. The same occurred for the treatments carried out with isolated CAD and PUT, since none of the concentrations analyzed induced malformations in the embryonic zebrafish. The treatment performed with the M2 mixture (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT) showed the highest embryotoxicity. At this concentration, 21% of zebrafish embryos tested (FET test – 96h of exposure) were carriers of morphological changes: pericardial edema and spinal deficiency malformations were the most observed. The M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT) and M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD) treatments induced malformations in 4%, including pericardial edema and spinal deficiency (Figure 5). It was not possible to obtain malformation data for M4, as this concentration was toxic to *D. rerio*. The malformations found in the acute toxicity assessment for zebrafish exposed to the CAD and PUT mixture are displayed in Figure 6.

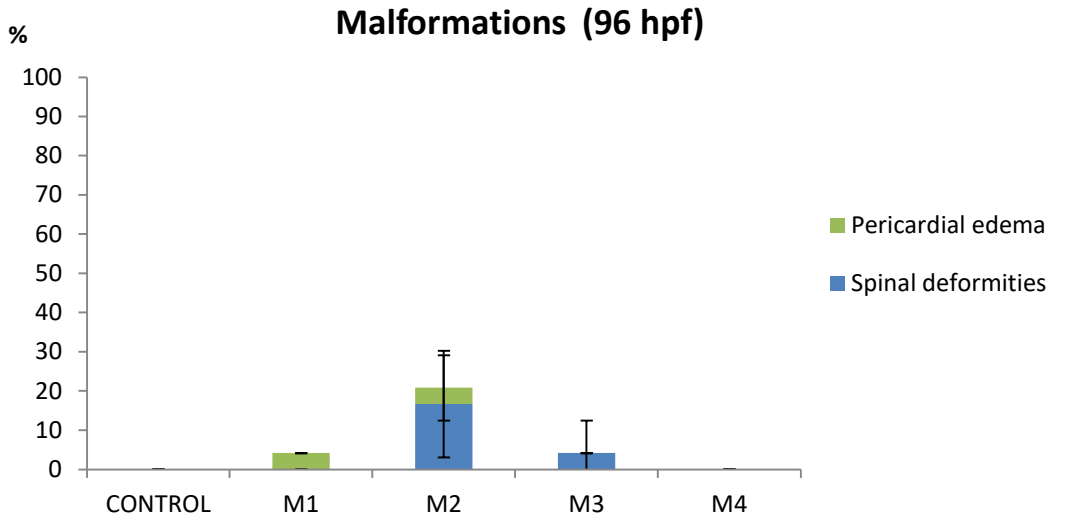


Figure 5. Malformations in zebrafish after 96h of exposure to different concentrations of cadaverine and putrescine mixtures. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (CL_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett ($p<0.05$).

Figure 6. Morphological changes in zebrafish larvae after 96h of exposure to different concentrations of cadaverine and putrescine mixtures. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (CL_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett ($p<0.05$). **A**: control (without malformations). **B**: pericardial edema. **C**: spinal malformation. Source: Prepared by the author.

3.2 Assessment of acute toxicity in *D. magna*

The results of the toxicity for *D. magna* exposed to the BAs CAD and PUT showed that CAD is highly toxic to the microcrustacean. All evaluated concentrations of these BAs were lethal for *D. magna*, when compared to that of the control group. The observed lethality for the control group was < 20%.

The lowest concentration tested (C1 – 10 mg. L^{-1}) caused a lethality of 65% of the individuals. Treatments C2 (16 mg. L^{-1}) and C3 (16 and 25.6 mg. L^{-1}) showed 55 and 65% lethality, respectively. The treatments with the highest concentrations (C4, C5 and C6) caused a lethality of 100% of the individuals.

From these results, the mean lethal concentration (LC_{50}) of CAD was calculated after 48h of exposure, the value of which was 9.51 mg. L^{-1} (Figure 7A).

The results obtained with PUT also showed lethality for *D. magna*. However, the acute toxicity of PUT was lower than that of CAD. Treatment C1 (10 mg. L^{-1}) resulted in 20% lethality, while C2 and C3 caused 10% lethality when compared to the control group. The treatments with the highest concentrations (C4, C5 and C6) caused 100, 65 and 70% lethality, respectively. The LC_{50} value (36.74 mg. L^{-1}) obtained in the 48h of exposure assays appears in Figure 7B.

The lethality results obtained with *D. magna* for the treatments with the mixture of CAD and PUT amines were not statistically different from those of the control. Concentrations M1 and M3 induced 25% lethality; M2, 8%; M4, 29%; and the control, 17%. The results are shown in Figure 8.

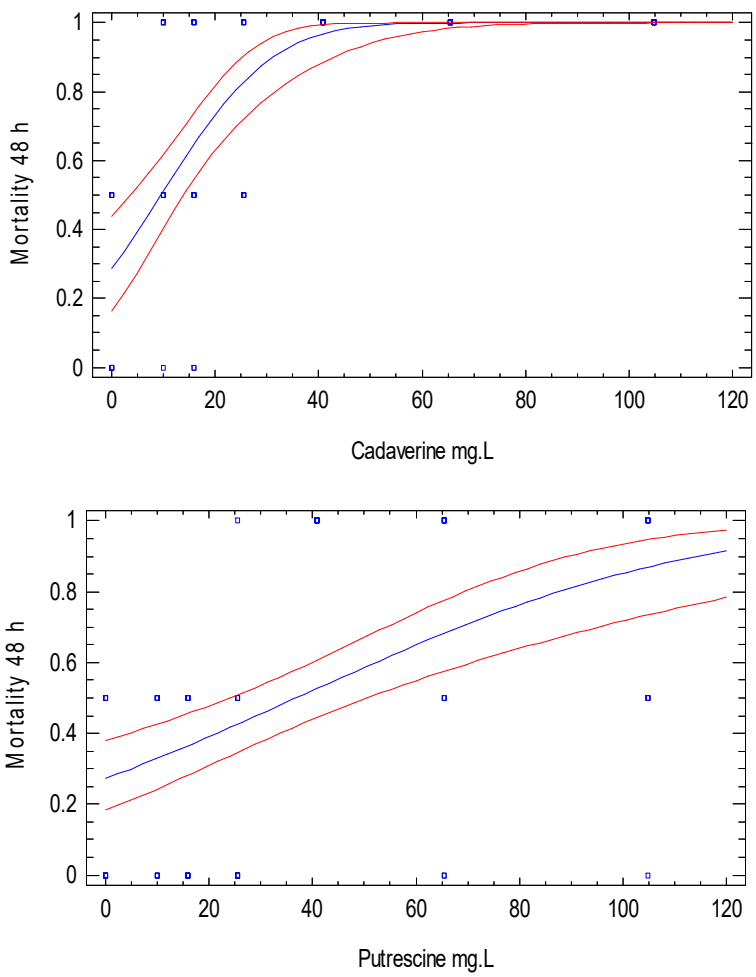


Figure 7A. Regression analysis for the calculation of cadaverine LC_{50}. **B**. Regression analysis for calculation of the putrescine LC_{50}. Probit Analysis.

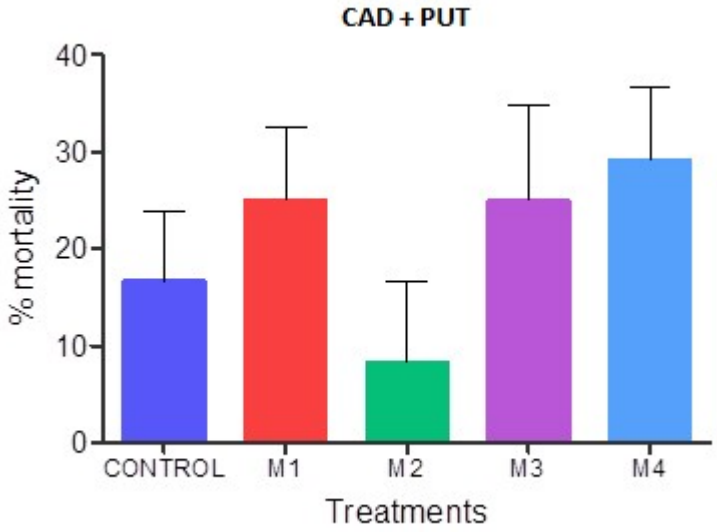


Figure 8. Lethality of *D. magna* exposed to different concentrations of a cadaverine and putrescine mixtures. M1 (1/10 LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M2 (LC_{50} CAD + 1/10 LC_{50} PUT); M3 (LC_{50} PUT + 1/10 LC_{50} CAD); M4 (LC_{50} CAD + LC_{50} PUT). ANOVA/Dunnett ($p>0.05$).

4. DISCUSSION

Cemeteries are among the most silent and continuous sources of soil and groundwater contamination. The decomposition of human as well as of animal carcasses should be considered a natural phenomenon. However, during the decomposition process, toxic metabolites are produced that can pose a risk both to the physical environment (water and soil) and to the biology of the contaminated site, in addition to threatening human health (Zhou et al., 2021). The necro-leachate generated from this process can infiltrate the soil and contaminate groundwater, in addition to contributing to the increase of microbiological contamination from heavy metals and toxic organic pollutants (Franco et al., 2022).

From the results of the tests carried out with *D. rerio* and *D. magna*, exposed separately to BAs, it was possible to infer that CAD was more lethal than PUT, although the hatching delay values, and morphological changes, were not statistically different from those of the control group.

The assays performed with *D. rerio* exposed to the CAD and PUT mixtures show that these amines, when associated with each other, can increase the lethality rate, and induce delays in hatching and malformations in zebrafish larvae. Some authors also cite that CAD and PUT mixtures are more toxic than isolated amines, due to synergistic effects occurring between them, which

potentiates the toxicity of other BAs such as histamine and tyramine (Donato et al., 2022; Saad et al., 2022). Among the morphological changes in zebrafish co-exposed to the BAs evaluated in this study, most notable are the pericardial edema and spinal deficiencies.

Pericardial edema is identified by increased fluid in the pericardium. This malformation is a cardiovascular abnormality resulting from both an increased permeability of blood vessels and the accumulation of contaminants in tissues (Vallim et al., 2022; Wu et al., 2019). According to Cooman et al (2022), another common phenotype observed in embryotoxicity assays is spinal deformities after exposure to different xenobiotics. Studies showed that tail curvature may be associated with neuroinflammation caused by environmental pollutants (Iqubal et al., 2020; Massei et al., 2019).

The cytotoxic effect of CAD and PUT during zebrafish embryogenesis may be explained by its nucleophilic and polycationic nature at physiological pH. According to Pelka et al (2017), the lipophilic characteristics, the electrical charge, and the structural conformation of a molecule, can all play an important role in the absorption of chemicals through the chorion of the zebrafish embryo. Furthermore, they may interact with negatively charged chemical species of DNA, RNA, and proteins (Kumar et al., 2021). This effect was reported by Del Rio et al (2019) for HT29 intestinal cell cultures exposed to these BAs. The authors correlated the cytotoxicity of CAD and PUT with the possibility of amine interaction with phospholipids (of an anionic nature) and by the destabilization of cell membranes. This information may explain the appearance of malformations in the present study, but further studies are necessary to confirm this hypothesis.

The *D. magna* organisms showed greater sensitivity to an isolated BA when compared to that of the acute toxicity tests using zebrafish. CAD also showed a higher level of toxicity for this organism when compared to PUT (CAD LC_{50} of 9.51 mg. L^{-1} and PUT LC_{50} of 36.74 mg. L^{-1}). However, the BA mixture did not significantly increase the lethality of exposed individuals at any of the evaluated treatments.

Although there are no scientific references regarding an assessment of the acute toxicity of these BAs in *D. magna*, studies by Spadotim (2015) carried out using water samples near a cemetery in the city of Limeira, São Paulo State, Brazil, confirmed the acute toxicity of these samples in relation to the

microcrustaceans *D. magna* and *Ceriodaphnia dubia*. The authors also related this toxic effect on the test organisms to the high zinc concentration recorded in the evaluated waters. According to Wieczorek et al (2021), CAD and PUT increased the lethality of the aphid *Cinara cupressi*, as well as significantly reducing the fecundity of these organisms in up to five generations.

According to Netto et al. (2021) and Oliveira et al. (2022), ecotoxicological tests performed with non-target organisms is an attractive strategy to estimate tolerable concentrations of toxic compounds present in the environment. Thus, the tests carried out here with the bioindicators *D. rerio* and *D. magna*, to evaluate the toxicity of BAs in cemetery environments, present important data that may assist in providing consistent information about the risks and environmental tolerances of this type of contamination.

A study presenting results from with the BAs CAD and PUT is unprecedented because although the toxicity of these amines in food is well known, little is known about the environmental impacts and effects on human health of BAs derived from putrefactive processes in cemeteries. Considering the high and continuous production of these amines in necropolises, the increase in burials in the last two years, resulting from the SARS-CoV-2 Pandemic Gonçalves et al. (2022), as well as the absence of management and treatment of effluents emitted by decomposing bodies, and the possibility of contamination of groundwater near cemeteries (Neckel et al., 2017), these amines should be further investigated, regarding their risks to the environment and human health. The originality of this study also lies in the type of evaluation carried out, with bioindicators and biomarkers of recognized efficiency for monitoring quality and/or environmental impacts (Belaid and Sbartai, 2021; Anifowoshe et al., 2022; Lee et al., 2022; Howe et al., 2013) indicated by important environmental agencies around the world (e.g. OECD, USPEA, CONAMA-BR).

5. CONCLUSION

The data from the present study confirm the toxic potential of the BAs CAD and PUT on the aquatic organisms *D. rerio* and *D. magna*. Delays in hatching and malformations during the embryonic development of the fish, as well as an increased lethality for the water flea *D. magna* were observed. Although mixtures BAs did not provide significant toxic effects to *D. magna*, compared to the control

group, CAD showed higher toxicity values than PUT. Mixtures of these substances have already triggered more worrying toxic effects to *D. rerio*. These data on the toxicity of BA mixtures reinforce the need for studies that assess impacts on the soil and groundwater around cemeteries, as these amines are released concomitantly during the cadaveric putrefaction process.

Given these observations, it is possible to conclude that the test organisms used in the study were efficient in assessing the toxicity of the BAs CAD and PUT. The proven toxicity of these amines highlights the requirement for more efficient environmental management in cemeteries, which should help to control necropolis pollution.

Authors' contributions

Author 1: responsible for test development; collected, analyzed the data and wrote the first draft of the manuscript. **Authors 2 and 3**: contributed to the performance of bioassays and data analysis. **Authors 4 and 5**: acting in the supervision, conceptualization, and revision of the entire manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

We would like to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior) for supplying a scholarship to the first author and Embrapa Environment for providing support for the development of this research.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Abuhlega, T.A., Ali, M.R., 2022. Biogenic amines in fish: Prevention and reduction. J. Food Process. Preserv. 1–15. https://doi.org/10.1111/jfpp.16883

Afangideh, C.B., Udokpoh, U.U., 2022. Environmental impact assessment of groundwater pollution within cemetery surroundings. Int. J. Eng. 19.

Anifowoshe, A.T., Roy, D., Dutta, S., Nongthomba, U., 2022. Evaluation of cytogenotoxic potential and embryotoxicity of KRS-Cauvery River water in zebrafish (Danio rerio). Ecotoxicol. Environ. Saf. 233, 113320. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113320

Batista, F.S., Cruz, M.J.M., Anjos, J.Â.S.A. dos, Gonçalves, M.V.P., Porciúncula, D.C.L. da, Andrade, J.J. de S., 2022. Geo-Environmental Assessment and Quality of Groundwater in the Complex of Cemiteries: Quinta Dos Lázaros Salvador, Bahia, Brazil. Int. J. Hum. Sci. Res. 2, 2–25. https://doi.org/10.22533/at.ed.558282201042

Belaid, C., Sbartai, I., 2021. Assessing the effects of Thiram to oxidative stress responses in a freshwater bioindicator cladoceran (Daphnia magna), Chemosphere. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128808

Cooman, T., Bergeron, S.A., Coltogirone, R., Horstick, E., Arroyo, L., 2022. Evaluation of fentanyl toxicity and metabolism using a zebrafish model. J. Appl. Toxicol. 42, 706–714. https://doi.org/10.1002/jat.4253

Crisanto-Perrazo, T., Guayasamín-Vergara, J., Mayorga-Llerena, E., Sinde-Gonzalez, I., Vizuete-Freire, D., Toulkeridis, T., Gomez, G.F., Fierro-Naranjo, G., 2022. Determination of Empirical Environmental Indices for the Location of Cemeteries—An Innovative Proposal for Worldwide Use. Sustain. 14. https://doi.org/10.3390/su14106284

Dasa, F., Bejo, W., Abdo, T., 2022. Importance and Toxicity of Biogenic Amines in Fresh and Processed Foods. J. Food Technol. Nutr. Sci. 4, 1–8.

del Rio, B., Redruello, B., Linares, D.M., Ladero, V., Ruas-Madiedo, P., Fernandez, M., Martin, M.C., Alvarez, M.A., 2019. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. Sci. Rep. 9, 1–7. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36239-w

Donato, F., Greco, R., Carpentieri, C., Pittore, B., D'Orlando, C., Donato, A., Malara, N., Donato, G., 2022. All ptomaines fault! The strange story of the cadaveric alkaloids, from forensic medicine to molecular biology passing through the asylum. Med. Hist. 6.

Franco, D.S., Georgin, J., Villarreal Campo, L.A., Mayoral, M.A., Goenaga, J.O., Fruto, C.M., Neckel, A., Oliveira, M.L., Ramos, C.G., 2022. The environmental pollution caused by cemeteries and cremations: A review. Chemosphere 307, 136025. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136025

Gómez, F.G., Crisanto-Perrazo, T., Toulkeridis, T., Fierro-Naranjo, G., Guevara-García, P., Mayorga-Llerena, E., Vizuete-Freire, D., Salazar, E., Sinde-Gonzalez, I., 2022. Proposal of an Initial Environmental Management and Land Use for Critical Cemeteries in Central Ecuador. Sustain. 14. https://doi.org/10.3390/su14031577

Gonçalves, L.R., Roberto, M.M., Braga, A.P.A., Barozzi, G.B., Canizela, G.S., de Souza Gigeck, L., de Souza, L.R., Marin-Morales, M.A., 2022. Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic—the environmental impact. Environ. Sci. Pollut. Res. 29, 1696–1711. https://doi.org/10.1007/s11356-021-17098-x

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F. et al.. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature 496, 498–503. https://doi.org/10.1038/nature12111

Idehen, O., 2020. A Comparative Investigation of Groundwater Contamination in Typical Dumpsites and Cemetery Using Ert and Physicochemical Analysis of Water in Benin Metropolis, Nigeria. J. Geosci. Environ. Prot. 08, 72–85. https://doi.org/10.4236/gep.2020.81005

Idehen, O., Ezenwa, I., 2019. Influence of Third Cemetery Location on the Quality of Domestic and Groundwater Resources in Benin City, Nigeria. J. Appl. Sci. Environ. Manag. 23, 5. https://doi.org/10.4314/jasem.v23i1.1

Iqubal, A., Ahmed, M., Ahmad, S., Sahoo, C.R., Iqubal, M.K., Haque, S.E., 2020. Environmental neurotoxic pollutants: review. Environ. Sci. Pollut. Res. 27, 41175–41198. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10539-z

Kumar, S., Arockiaraj, M., Esokkiya, A., Sudalaimani, S., Hansda, S., Sivakumar, C., Sulaiman, Y., Khan, M.M., Giribabu, K., 2021. Ion-Pair Facilitated Non-Enzymatic Electrochemical Sensing of Cadaverine and Putrescine. J. Electrochem. Soc. 168, 047505. https://doi.org/10.1149/1945-7111/abf263

Lee, Y.L., Shih, Y.S., Chen, Z.Y., Cheng, F.Y., Lu, J.Y., Wu, Y.H., Wang, Y.J., 2022. Toxic Effects and Mechanisms of Silver and Zinc Oxide Nanoparticles on Zebrafish Embryos in Aquatic Ecosystems. Nanomaterials 12, 1–18. https://doi.org/10.3390/nano12040717

Lovern, S.B., Hart, R. Van, 2022. Impact of oxytetracycline exposure on the digestive system microbiota of Daphnia magna. PLoS One 17, 1–8.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265944

Massei, R., Hollert, H., Krauss, M., von Tümpling, W., Weidauer, C., Haglund, P., Küster, E., Gallampois, C., Tysklind, M., Brack, W., 2019. Toxicity and neurotoxicity profiling of contaminated sediments from Gulf of Bothnia (Sweden): a multi-endpoint assay with Zebrafish embryos. Environ. Sci. Eur. 31. https://doi.org/10.1186/s12302-019-0188-y

Neckel, A., Costa, C., Mario, D.N., Sabadin, C.E.S., Bodah, E.T., 2017. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. urbe. Rev. Bras. Gestão Urbana. https://doi.org/10.1590/2175-3369.009.002.ao05

Neckel, A., Korcelski, C., Kujawa, H.A., Schaefer da Silva, I., Prezoto, F., Walker Amorin, A.L., Maculan, L.S., Gonçalves, A.C., Bodah, E.T., Bodah, B.W., Dotto, G.L., Silva, L.F.O., 2021. Hazardous elements in the soil of urban cemeteries; constructive solutions aimed at sustainability. Chemosphere 262. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128248

Netto, L.G., Filho, W.M., Moreira, C.A., di Donato, F.T., Helene, L.P.I., 2021. Delineation of necroleachate pathways using electrical resistivity tomography (ERT): Case study on a cemetery in Brazil. Environ. Challenges 5, 100344. https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100344

Oliveira, A.E. De, Saba, E.D., Saba, J.M., Saba, E.D., Saba, J.M., Mendes, T.A., 2022. Groundwater Vulnerability and Cemetery Urbanization Areas Groundwater Vulnerability and Cemetery Urbanization Areas 0–25.

Pelka, K.E., Henn, K., Keck, A., Sapel, B., Braunbeck, T., 2017. Size does matter – Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (Danio rerio) embryos. Aquat. Toxicol. 185, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.015

Rauscher-Gabernig, E., Gabernig, R., Brueller, W., Grossgut, R., Bauer, F., Paulsen, P., 2012. Dietary exposure assessment of putrescine and cadaverine and derivation of tolerable levels in selected foods consumed in Austria. Eur. Food Res. Technol. 235, 209–220. https://doi.org/10.1007/s00217-012-1748-1

Rodrigues, L., Pacheco, A., 2003. Groundwater contamination from cemeteries cases of study. Environ. 2010 Situat. Perspect. Eur. Union 1–6.

Saad, M.A., Abd-Rabou, H.S., Elkhtab, E., Rayan, A.M., Abdeen, A., Abdelkader, A., Ibrahim, S.F., Hussien, H., 2022. Occurrence of Toxic Biogenic Amines in Various Types of Soft and Hard Cheeses and Their Control by Bacillus polymyxa D05-1. Fermentation 8, 1–12. https://doi.org/10.3390/fermentation8070327

Silva, R.B.P. da, Campos, M.C.C., Silva, L.S., Filho, E.G. de B., Lima, A.F.L. de, Pinheiro, E.N., Cunha, J.M., 2020. Concentration of Heavy Metals in Soils under Cemetery Occupation in Amazonas, Brazil. Soil Sediment Contam. 29, 192–208. https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1696280

Spadotim, R.F., 2015. Avaliação Ecotoxicológica e identificação da toxicidade no Ribeirão Pires, Limeira - SP.

Vallim, J.H., Clemente, Z., Castanha, R.F., do Espírito Santo Pereira, A., Campos, E.V.R., Assalin, M.R., Maurer-Morelli, C.V., Fraceto, L.F., de Castro, V.L.S.S., 2022. Chitosan nanoparticles containing the insecticide dimethoate: A new approach in the reduction of harmful ecotoxicological effects. NanoImpact 27. https://doi.org/10.1016/j.impact.2022.100408

Viegas, C., Cervantes, R., Dias, M., Gomes, B., Pena, P., Carolino, E., Twarużek, M., Kosicki, R., Soszczyńska, E., Viegas, S., Caetano, L.A., 2022. Six Feet under Microbiota: Microbiologic Contamination and Toxicity Profile in Three Urban Cemeteries from Lisbon, Portugal. Toxins (Basel). 14. https://doi.org/10.3390/toxins14050348

Wieczorek, K., Świątek, P., Durak, R., 2021. Influence of selected biogenic amines on development and demographic parameters of a temperate population of Cinara (Cupressobium) cupressi (Hemiptera, Aphididae). Arthropod. Plant. Interact. 15, 583–593. https://doi.org/10.1007/s11829-021-09839-z

Wójcik, W., Łukasiewicz, M., Puppel, K., 2020. Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. J. Sci. Food Agric. https://doi.org/10.1002/jsfa.10928

Wu, Y., Zhang, Y., Chen, M., Yang, Q., Zhuang, S., Lv, L., Zuo, Z., Wang, C., 2019. Exposure to low-level metalaxyl impacts the cardiac development and function of zebrafish embryos. J. Environ. Sci. (China) 85, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.03.019

Zhou, R., Yu, Q., Li, T., Long, M., Wang, Y., Feng, T., Su, W., Yang, J., Li, H., 2021. Carcass decomposition influences the metabolic profiles and enriches noxious metabolites in different water types by widely targeted metabolomics. Chemosphere 269, 129400. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129400

Zychowski, J., Bryndal, T., 2015. Impact of cemeteries on groundwater contamination by bacteria and viruses - A review. J. Water Health 13, 285–301. https://doi.org/10.2166/wh.2014.119

Artigo 4

The zebrafish as an alternative animal model for ecotoxicological research and testing

Ana Paula Andrade Braga[1*], Letícia Rosa de Souza[1], Maria Gabriela Franco Lima[1], Jaqueline Matos Cruz[1], Ana Cristina Zullo de Souza[1], Mariana Santos Costa[1], Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro[2], Maria Aparecida Marin-Morales[2]

[1]Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Av. 24-A, 1515, P.O Box 178, Rio Claro, São Paulo 13506-900, Brazil
[2]Laboratory of Ecotoxicology and Biosafety, Embrapa Environment, Highway SP-340, km 127.5, Jaguariúna, São Paulo 13918-110, Brazil

Abstract

Anthropogenic interventions have had a compromising effect on environmental health, intensifying the degradation of ecosystems, and the quantity of chemical pollutants released into nature. Therefore, research areas within the scope of environmental assessments and monitoring such as ecotoxicology have contributed to the determination of the toxic potential of contaminants. A small cyprinid known as the zebrafish (*Danio rerio*), the use of which has exponentially grown, is an alternative vertebrate model for scientific research, mainly in the assessment of environmental risks. The species exhibits several advantages for breeding in a laboratory, in addition to presenting multi-biomarkers of environmental toxicity. Thus, this review aims to present the main characteristics and advantages of working with this species, as well as showing studies related to ecotoxicology involving biomarkers of toxicity in zebrafish. The results show a progressive trend towards employing the species in environmental risk analyses, it being an increasingly recommended species in the assessment of the toxicity level of a range of chemical pollutants. The development of future technologies must contribute to scientific advancement, rendering the potential application of this model organism an even more widespread one, which will certainly help in bridging knowledge gaps in various areas of study.

Keywords: Ecotoxicology, toxicity biomarkers, environment pollution, *Danio rerio*, model organism

Graphical abstract

*Corresponding author: apandradebraga@gmail.com

Introduction

In recent decades, an imbalance in anthropic activities has led to a degradation of the environment, this being one of the biggest socio-environmental problems around the world.[1] The exacerbated process of urban, industrial, and agricultural sprawl has become a threat to all forms of life.[2] These practices greatly contribute to the release of new chemicals into the environment, which are often able to interact with Earth's physical and biological components, even interfering with its natural environmental cycles.[3,4] The main sources of environmental contamination include the disposal of solid waste, the release of untreated effluents, and the indiscriminate use of agrochemicals in agriculture.[5] Moreover, tannery processes, pharmaceuticals, fossil fuels, and mining industries also represent sectors that contribute concomitantly to the instability of ecosystems.[2]

The translational science of ecotoxicology came to the fore with the intention of optimizing environmental assessments and monitoring. The tests allow researchers to elucidate the response of organisms to exposure to different test substances.[6,7] In addition, ecotoxicological analyses are based on the protection of ecosystems and the prevention of environmental contamination.[8] One of the most sensitive bioindicators of environmental change is fish species.[9] For this reason, they are models widely applied in toxicology studies, and are considered essential animals for research, especially in the field of ecotoxicology.[10] Besides the economic and ecological importance, fish are excellent model organisms because they have several biomarkers of contamination, that superimposes on mammalian models.[11] However, for some decades, the ethics of scientific research with animal models used in laboratory experiments has been debated.[12] Since then, there has been a tendency to decrease the use of sentient animals throughout the scientific community. Therefore, the application of alternative models that comply with the 3Rs principle (replacement, reduction, and refinement) are increasingly encouraged.[13,14]

The zebrafish embryos (<120 hours old) is considered an alternative model as it conforms to the 3Rs of animal experimentation.[15] Besides this, it is a species widely used in ecotoxicological research.[16] Since zebrafish embryos easily absorb molecules inserted into their water, the first studies with the species were already based on the teratogenic effects in embryos previously exposed to

chemical substances.[17–19] Since then, zebrafish have been used as a tool in toxicological analysis.[19] Among the main features that make *D. rerio* an excellent model for such assessments is their short life cycle, rapid attainment of reproductive maturity, short and external embryonic development, transparent embryos, high egg permeability, low cost of laboratory maintenance, ease of reproduction, and the high quantity of eggs produced by the female.[20] Furthermore, the species shares 70% of orthologous genes with humans and has body plan similarities, making it additionally a promising model for molecular studies.[21]

The mode of action of test substances in *D. rerio* can be understood through analyses with embryos, larvae, or adult fish. The evaluation parameter follows different approaches since the species is a strong model for addressing emerging questions in toxicology, such as the influence of xenobiotics on the onset of health and disease.[22] As a result, zebrafish have become popular within several lines of biological research and present biomarkers related to different organisms' physiological systems and chemical modes of action.[23]

Some aspects pertaining to the zebrafish reproduction and embryo-larval tests will be discussed below. Subsequently, some of the most relevant research areas that use zebrafish as an animal model will be discussed. Thus, this review was carried out to present the advantages and use of zebrafish as an animal model in scientific research. We focused, with great emphasis, on the different biomarkers of environmental assessment that the species presents, as well as advances in its applicability in experimental ecotoxicology.

Zebrafish embryos as a toxicity model

In recent decades, the zebrafish embryotoxicity test has gained a good scientific reputation, especially in toxicological assessments. It is considered a low-cost and easy-handling test when compared to those of other vertebrate models.[24] The zebrafish embryo toxicity assay has shown a high correlation of results with mammals, including humans.[25,26] The method is standardized and recommended by several countries[27] and is considered an excellent alternative model by the European Centre for the Validation of Alternative Methods. Furthermore, in the European Union, ethics committee approval is not required for experiments with embryos of up to 72 hpf, because they are considered *in*

vitro tests.[28,29] It is an experiment that makes it possible to reduce the use of higher vertebrates, and presents methodological refinement, reducing injuries and the mistreatment of laboratory animals.[30,31]

The direct visualization of the embryo phases *in vivo* allows the evaluation of the effects of different compounds in the first 96h of life.[32] Exogenous substances easily interfere with the natural development of embryos during ontogenesis[28]; and because they are whole organisms, the permeability of the chorion by small molecules can occur in the first stages of life, a process unlikely to be found in cell culture systems.[33] The main phases of zebrafish development are illustrated in Figure 1.

According to OECD (test 236), zebrafish embryos are exposed to the test substance at the blastula stage (3hpf). The toxic level of the test substance is characterized by parameters such as egg coagulation, hatching rate, pericardial edema, lack of pigmentation, body length, heartbeat, and malformations of the head, tail, and yolk sac.[34] With the aid of a stereomicroscope, the parameters are analyzed every 24h for a total period of 96h (OECD, 2013). At the conclusion of the test, an effective concentration (EC50), or even a lethal concentration of the test substance (LC50), may be estimated, thus evaluating the level of teratogenic effects in zebrafish.

Recent research shows the ecotoxicological effects of a range of contaminants in the early life stages of zebrafish development.[35–40] Low concentrations of polyethylene microplastic had a negative effect on the embryonic development of *D. rerio*[23]. The authors reported a significant difference in egg hatching rates and larval survival up until the end of exposure (96 hpf).[23] Some studies[41] show the high rate of mortality and malformations in *D. rerio* embryos exposed to petroleum-derived oils. Phenotypic effects such as a pericardial edema, yolk sac malabsorption, and spinal deformities were the most frequent abnormalities. Pharmaceuticals are a threat to the environment and are often found in even higher concentrations than pesticides in river sediment samples. [42] Researchers reported the severe teratogenic effect of drugs in the early development of zebrafish, demonstrating acute toxicity with greater lethality in the first 24 hpf.[42]

Data in the literature using *D. rerio* as a bioindicator of embryotoxicity caused by agricultural productions are also increasing in the scientific

environment. Malformations in zebrafish larvae exposed to the insecticide Fipronil induced decreased larvae length, heart defects, and diminishment of egg hatchability occurred.[43] Ecotoxicological effects on *D. rerio* embryos are also reported as a result of exposure to herbicides.[44] The authors have elucidated the effects of Orbencarb, an herbicide widely used in the agricultural sector. The results showed that the substance negatively affected the organogenesis of previously exposed individuals.[44] Furthermore, Orbencarb compromised embryo viability and induced morphological abnormalities in the brain, yolk sac, and spinal cord of zebrafish larvae.[26]

Despite the scientific relevance of toxicity tests using zebrafish embryos, the model still has some limitations that must be considered. The main difficulty is related to the presence or absence of chorion, a structure that surrounds and protects the embryo against exogenous pollutants until hatching time.[16] Its structure has a large number of pores of up to 500 nm, which can hinder the absorption of molecules through partial isolation of the embryo from external components.[45] The chorion can block the absorption of SiO2 and TiO2 nanoparticles (>50nm).[46] Additionally, nano-plastic particles (100nm) can be effectively blocked.[47] For this reason, there is the possibility of generating false negatives in embryotoxicity assays.[48]

Some approaches to assessment have included chorion removal in treatment protocols, which allows for the initiation of exposure prior to hatching.[49] Chorion removal increased the toxicity of six organophosphate compounds when compared to embryos with intact chorion.[50] The authors reported a higher incidence of mortality and malformations in dechorionated embryos. However, one of the disadvantages of removing the chorion before exposure is that it prevents the use of hatching as a target in toxicological assessments; whereas compounds that specifically inhibit hatching lead to secondary phenotypic responses, such as a wavy notochord and malformations in somites.[51] These effects are due to a lack of hatching rather than a primary response to contaminant exposure. Chorion removal is therefore critical to improve assay predictability when there is an obvious potential for false negatives due to its protective effect.[52]

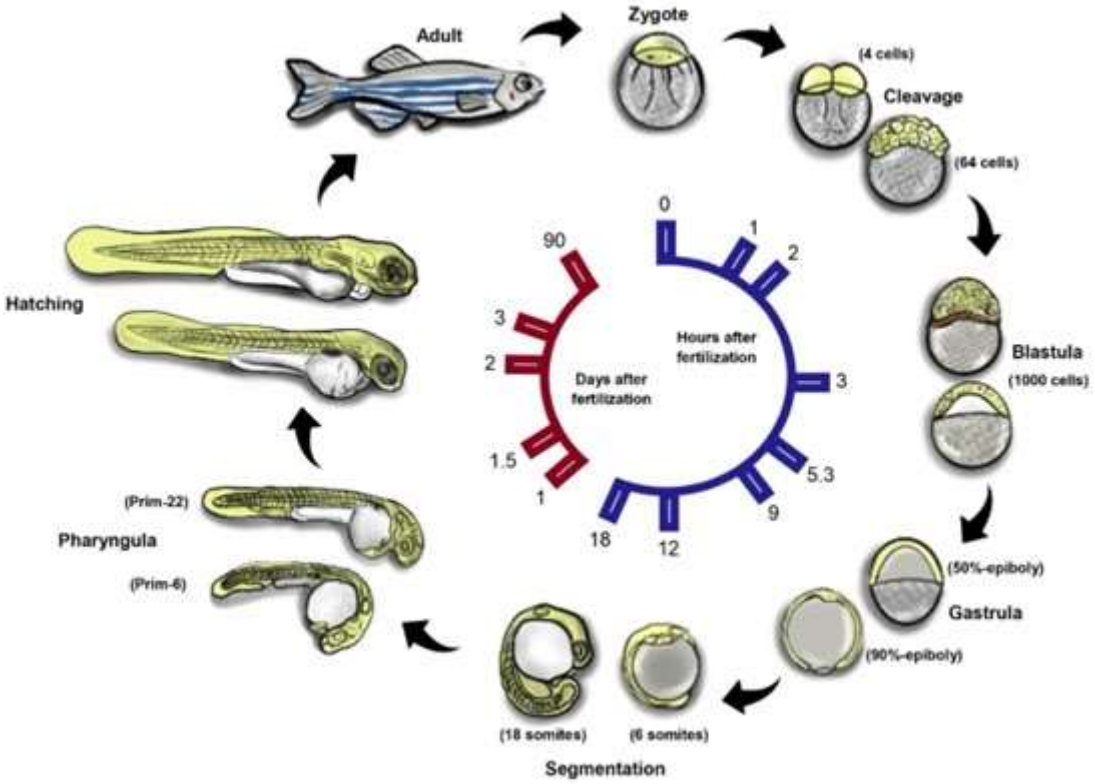


Figure 1. Life cycle and main stages of zebrafish development: Source: Illustrated by Tiago Rosa de Souza.

Toxicological studies

Immunotoxicity

The zebrafish has been reported as a robust animal model for *in vivo* immunology studies.[53–56] The transparency of the fish in the larval period enables the visualization of fluorescence-labeled molecules. Thus, it is possible, for example, to monitor the migration of cells to the site of infection.[57] From an immunological point of view, zebrafish possess cells, receptors and cytokine expression that are also found in humans. There are 19 putative genes for Toll-like receptors (TLR) in Zebrafish.[58]

A disturbance of the immune system due to exposure to environmental contaminants can lead to serious changes in the environment's pathogen-host balance: once the system is disturbed, innate cellular immune responses may fail to defend against infections.[59]

The main pro-inflammatory cytokines are currently in use as immunotoxicology markers against various environmental contaminants.[54–56]

Exposure of zebrafish embryos to concentrations lower than 3 mg/L of cypermethrin (pesticide) can induce the transcription of genes related to cellular apoptosis and immunotoxicity.[53] Studies used zebrafish larvae to determine immunotoxicity against exposure to graphene oxide, using the expression of tumor necrosis factor (TNF-alpha), interleukin 1 (IL-1), and interleukin 6 (IL-6) as biomarkers. The results of this study showed a significant increase in the expression of these cytokines after 14 days of exposure to graphene oxide at different concentrations.[55]

Contaminants such as atrazine, a pesticide widely used in various agricultural crops, can cause altered expressions of cytokines such as TNF-alpha, interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 8 (IL-8).[56] In a study in which zebrafish embryos were exposed to the herbicide Butchlor, it was possible to observe that the mRNA level of genes related to innate immunity in embryos was significantly induced by Butchlor. The expression of cytokine genes such as IL-lß, CXCL-C1c, CC-chem, and IL-8 in early development was induced dependently to the Butchlor concentration. The cytokine IL-1ß acts on the recruitment of neutrophils and macrophages at the site of the lesion. On the other hand, the cytokines IL-8, CXCL-C1c and CC-chem are inflammatory mediators.[60]

Genotoxicity

Genotoxicity tests seek to identify primary DNA damage, which may be reversed by repair mechanisms, and therefore are not transmitted to daughter cells. In addition, these assays enable the investigation of changes in mechanisms that affect the conservation of genome integrity.[61] The most widely used approaches in genotoxicity testing involve the identification of endpoints, such as DNA breaks, chromosomal aberrations, and micronucleus frequency.[62] In view of this, for the study of xenobiotic genotoxicity, the zebrafish model has also proved to be an excellent one and been used in tests to evaluate the most diverse compounds through assays that identify such endpoints.

The Comet Assay (Single Cell Gel Electrophoresis) is a test that allows the identification of DNA breaks, one of the endpoints of genotoxicity, to take place. It is a test characterized as sensitive and efficient in detecting the genotoxic potential of various substances, and can be performed on a variety of organisms, including on zebrafish.[63] Tests performed with environmental samples[64,65],

pesticides[66–68] and metals [69–71] confirm the use of the zebrafish, in various forms (embryos or cells isolated from specific tissues), as a sensitive model for the detection of damage to genetic material. [72]

Another test capable of identifying the genotoxicity of substances is the Micronucleus Test (MN). Micronuclei are small extranuclear structures that may be formed of chromosome fragments or entire chromosomes, which did not join the others during anaphase, and therefore were not included in the daughter cell nucleus. The MN test can identify both the clastogenic and aneugenic effects of compounds, in addition to being highly sensitive and predictive, easy to perform and applicable to different cell types.[73] Through the MN test, it is also possible to use zebrafish as a model for evaluating genotoxicity in various contexts, such as in water quality assessment[74], in water pollution, as a form of environmental monitoring[75,76], in the development of new drugs[77,78], and in the promotion of conscious and safe use of products.[79]

However, it is more common to use a combination of both tests the better to identify a substance's genotoxic mechanism of action, as well as the response of the body's repair system. Studies performing the Comet assay and MN Test in zebrafish liver cells, found a positive response for the former; that is, the compound induced DNA breaks. However, the authors state that the lesions were repaired, as it was not possible to detect the presence of MN in the cells.[80] In contrast, some researchers were able to correlate the two genotoxicity endpoints positively when studying the effect of the Spent Pot Liner (SPL), a residue generated during aluminum production, on zebrafish erythrocytes, since the induction of genetic material fragmentation and the increase in the frequency of MN suggested a clastogenic effect on the compound.[81]

Epigenotoxicity

Several studies using zebrafish have already demonstrated its effectiveness in the investigation of morphological and behavioral changes. However research that characterizes the mechanisms behind these changes and their transmission through generations is scarce.[82] Among these mechanisms are those that affect gene expression without altering the nucleotide sequence of DNA, which are identified through epigenetic changes, some of which are inherited by different generations.[83] The main ways by which gene expression can be epigenetically

affected are DNA methylation, histone modification, and non-coding RNAs.[84] Recently, studies that have linked epigenetic changes with exposure to toxic substances and environmental pollutants have identified several substances capable of altering these mechanisms.[85]

DNA methylation occurs when a methyl radical (-CH_3) is added, most commonly onto the carbon 5 of a cytosine, transforming it into a 5-methylcytosine. This phenomenon may result in the silencing of the gene corresponding to the methylated region.[86] The use of zebrafish is advantageous for understanding DNA methylation because its protein machinery involved in the process is similar to that of mammals.[87] For example, zebrafish have genes orthologous to those of mammals for the so-called DNA methyltransferases (DNMTs), enzymes responsible for adding the methyl group to DNA, especially in CpG dinucleotides.[88]

Bisphenol A, a chemical utilized in the production of epoxy resins and polycarbonate plastics, induced alterations in behavioral parameters, such as swimming. Such alterations are attributed to changes in the methylation patterns of nervous system-related genes.[89] In another study, the investigation of the epigenetic effects of the insecticide Fipronil showed that the deregulation of genes involving *D. rerio* development was related to their hypermethylation induced by the compound[90], corroborating the idea that this epigenetic mechanism is responsible for gene silencing.[91] Zebrafish was also used as a model to assess the epigenotoxic potential of water contaminated with trace metals. In this study it was demonstrated that the expression of repair and apoptosis genes was altered due to changes in DNA methylation in organs such as the liver and gills.[92]

Additionally, it was also possible to observe the transmission of epigenetic alterations throughout the generations in zebrafish. It was demonstrated, when exposing *D. rerio* embryos to different concentrations of methylmercury (MeHg), that generations not exposed to the contaminant showed both phenotypic effects (hyperactivity and visual impairment) and epigenetic changes in male gametes, which occurred through the increase of differentially methylated regions in genes associated with actin and cytoskeleton.[93] It was possible therefore to establish a direct relationship between the observed phenotypes and the molecular mechanism behind this alteration. In another investigation using the known

genotoxic compound, Benzo(a)pyrene, the authors stated that the alteration in DNA methylation levels added to the dysregulation of DNMT expression, indicates that the transgenerational inheritance of neurobehavioral and physiological alterations caused by the compound may have been caused by epigenetic changes in the methylation pattern in the *D. rerio* genome.[94]

There are also records of the use of zebrafish in studies involving other epigenetic mechanisms, such as histone modification. Such modifications occur by the addition of radicals and are called acetylation, methylation, and ubiquitination. Acetylation is associated with gene activation since it acts by making the chromatin structure more accessible to transcription factors. Methylation can act either by activating or inhibiting gene expression, depending on the number of radicals added and the position in which they are inserted into the histone tail, while ubiquitination is characterized by inhibiting gene expression.[95]

Studies using Bisphenol A showed that in both males and females, it was possible to observe changes in this epigenetic mechanism and how it had a direct influence on zebrafish reproduction. In females, the deregulation of reproduction-related genes, responsible for the maturation of oocytes, was a consequence of changes in the chromatin structure due to the modification of histones involved in transcription activation and gene silencing.[96] In males, the transmission of histone hyperacetylation patterns from the paternal epigenome to the progeny was observed, impairing the development of the embryo.[97] Zebrafish was also used to study the transmission of epigenetic changes, induced by arsenic (As) exposure, between generations of zebrafish. Phenotypic and epigenetic changes induced by the compound in the F0 generation, such as cognitive and motor impairment related to post-translational changes in histones of the nervous system's genes, were also observed in the F2 generation (the first not to be exposed to the contaminant).[98]

It is also possible to find in the literature studies that use *D. rerio* as a model for studying a third epigenetic mechanism: non-coding RNAs (ncRNAs). These RNAs, transcribed molecules that are not translated into proteins, play an important role in gene regulation through interaction with DNMTs and histones.[99] Currently, the most well-known types of ncRNAs are microRNAs (miRNAs), small interfering RNAs (siRNAs), PIWI-associated RNAs (piRNAs) and long non-

coding RNAs (lncRNAs). These studies focus on some ncRNAs present in zebrafish that are conserved among vertebrates, especially in humans. A study focused on the effects of Atrazine on the expression of miRNA-126, which is related to the process of angiogenesis during Zebrafish development. The author observed that the expression of this RNA was sensitive to compound exposure and might result in changes in the processes related to the formation of blood vessels and related structures.[84]

Zebrafish ncRNAs were also used to study epigenetic effects resulting from exposure to mercury (Hg). In this study, the authors correlated the neurotoxic effect of Hg with alterations in the expression of malat1, a lncRNA expressed mainly in the brain, neurocele, and notochord, and they state that this RNA is an excellent, specific, and sensitive marker for the study of mercury compounds and other toxic compounds.[100] Another type of ncRNA, miRNA miR-9, evolutionarily conserved and present in zebrafish, was also used to study ethanol exposure in embryos. The data suggested that miR-9 suppression resulted in the appearance of phenotypic characteristics related to ethanol exposure, demonstrating that this compound has a direct influence on miRNA expression.[101]

Specific organ toxicity

Cardiotoxicity

Throughout the last decades, *D. rerio* has proved to be a useful tool in relation to the studies and understanding of diseases in the field of cardiovascular research due to its similarities to humans. In addition to developing rapidly, another advantage it possesses over mammalian study systems is the external development of this species, which facilitates the study not only of its morphology but also of its physiology, such as electrical conduction and myocardial contraction.[102–104] The zebrafish heart is the first organ to develop perfectly, estimated at 22 hpf. At the end of 48 hpf, the cardiovascular system is fully functional, with a complex repertoire of metabolic processes and ion channels.[105,106]

Zebrafish and mammals share similar functional characteristics of the heart, including the directing of blood flow, a high-pressure system governed by endocardial musculature, a regulated heart rhythm, and heartbeats associated

with pacemaker activity. The potential morphology and basic contractile dynamics of this cardiac system, analogous to those of humans, allow the zebrafish to be a well-established model in experiments that focus on channelopathies and cardiomyopathies. The zebrafish heart has also revealed age-related changes in cardiac structure and function, such as myocyte hypertrophy, ventricular fibrosis, and valvular lesions. Furthermore, the pharmacological responses of the species to cardiotoxin exposure are similar to responses obtained in humans.[107–113]

Zebrafish embryos are commonly used in the investigation of the teratogenic effects of drugs. Therefore, the cardiac function of these animals needs to be evaluated to throw light upon the relationship between exposure and the development of the cardiovascular system.[114] The embryos have a heart composed of two chambers that remains visible during the first week of development. Transgenic strains of zebrafish, which express fluorescent proteins exclusively in the myocardium, have been developed to assist in monitoring the high heart rate in the species. [115,116]

In addition to transparency, which enables the direct observation of cardiac function, the zebrafish larval stage offers benefits in the study of the cardiovascular system regarding electrophysiological maturation and heartbeat rhythm, characteristics that reach stability from 96 hpf.[117,118] The *ex-situ* development also contributes to experiments involving transplantation, a technique considered laborious but very promising for the investigation of cellular autonomy. This technique has recently been expanded to include transparent adult zebrafish.[119,120]

The evaluation of gene expression in zebrafish can contribute to an extrapolation of the effects of tested compounds that induce cardiotoxicity, due to the conservation of molecular mechanisms between this species and human beings. Pyrimethanil fungicide-induced changes in the transcription of apoptosis-related genes (p53, Bax, Bcl2, Casp 9, and Casp6l1) and heart development-related genes (Tbx2b, Gata4, Myh6, Vmhc, Nppa, Bmp2b, Bpm 4 and Bpm 10) in zebrafish.[121] Other examples of genetic markers selected in cardiotoxicity studies in this species include SORBS2, RXRA, DNAJB6, and ANO5.[122]

Other authors have also investigated the cardiotoxic action of different groups of chemical compounds in zebrafish. This includes effects such as:

bradycardia, reduced contractility, and slow circulation provoked by medications (mitoxantrone, terfenadine, clomipramine, and thioridazine[106,123]; damage to the cardiovascular system caused by the pyrethroid insecticide deltamethrin[124]; and cardiac toxicity brought about by exposure to preservatives such as triclosan and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).[125]

Neurotoxicity

The global occurrence of neurological diseases has progressively increased due to several factors, including the rise in environmental contamination caused by neurotoxic substances present in the environment. Therefore, the assessment of neurotoxicity induced by chemical agents is an important challenge due to the morphological and physiological complexity of the central and peripheral nervous system.[126,127]

The zebrafish has become a well-established and widely used model in the investigation of neurological and behavioral damage from different exposures to xenobiotics.[128] Currently, both the animal in its early stages (embryonic and larval) and in the adult stage are used in tests to elucidate brain functions and dysfunctions that result from human neurological disorders. [129,130]

The neurotoxicological effects observed in zebrafish embryos can be evaluated in relation to their spontaneous movement, initiated at around 19-26 hpf, and characterized by head and tail curling.[131–133] During the larval stage, their behavior can be evaluated through the distance covered, time spent active, swimming patterns under light or dark conditions, or even the muscular activity produced in response to a loud sound, known as acoustic startle. [134–138] The evaluation of these parameters together can lead to the characterization of complex behaviors such as hypolocomotion, hyperlocomotion, motor incoordination, and sickness behavior, among others.[139]

Reports have shown that different concentrations of carboxyl graphene oxide nanoparticles induced embryo and neurodevelopmental abnormalities, as well as changes in larval locomotion when compared to the control.[140] Also, it was observed a decrease in swimming speed by up to 116 hpf in zebrafish larvae exposed to clozapine.[141] It was also reported that larvae exposed to a concentration of 6.4 mg/L of this antipsychotic showed reduced swimming (between 23% and 36%) throughout dark periods.[141] Toxic effects on zebrafish

neurodevelopment, such as spontaneous movement and swimming behavior abnormalities, produced by titanium and triphenyl phosphate nanoparticle were also observed.[142]

In adulthood, *D. rerio* individuals present socially interactive behavior in groups, having the ability to distinguish their conspecifics by general appearance, including color, shape, and stripe pattern.[143,144] Social behavior tests in adult zebrafish were developed based on the habituation, interaction, and reaction of individuals under social stimuli. Throughout the test, the fish are allowed to swim freely, and their social preferences may be assessed by measuring the time spent by fish in the zones of social stimulation.[145] Short-term exposure to oxybenzone in adult zebrafish induced individuals to spend less time interacting with the shoal due to a loss of social motivation, instead of the motor deficits caused by the exposure to the studied pollutant.[146],

In addition, other authors have reported anxiety-like larval behavior through thymotaxis, shown by the individuals having a preferred location at the edge of the aquarium.[147,148] The escape response to threatening stimuli was another behavior analyzed during this period.[149] Likewise, the neurotoxicological effects caused by xenobiotics are commonly investigated in adult zebrafish individuals; for example by inducing anxiety and testing aggressive behavior. [150,151]

The neurodevelopment of zebrafish shows similarities with the human species[152,153], in addition to its having neuroanatomical structures and organization homologous to those among mammals in the developing brain.[154,155] The species also has telencephalic neuroanatomical regions, an optic tectum, and a thalamus, hypothalamus, cerebellum, olfactory bulb, and spinal cord.[156,157] In this context, the presence of glial cells, astrocytes, oligodendrocytes, Purkinje cells, and myelin and neuronal circuits similar to those observed in mammals was also identified.[129,158,159]

The incorporation of chemical substances in the brain is restricted by the blood-brain barrier (BBB), present in mammals, responsible for maintaining homeostasis in the brain.[160] Zebrafish have a BBB similar to that of higher vertebrates (3 dpf), and as its embryonic and larval development occurs *ex utero*, access to the central nervous system is facilitated. Therefore, an animal model

with a BBB which resembles that found in mammals is of great interest for the study of neurotoxic diseases in humans.[152,161–163]

Like other vertebrates, the species has the classic sensory characteristics (sight, taste, hearing, smell, balance, and touch), and in general, shares similarities with humans.[164] Other studies also show the use of zebrafish to investigate the action of chemical agents on the sensorimotor system[165], regarding visual impairment[166,167], olfactory toxicity[168], ototoxicity[169,170], memory and learning[171,172], and locomotor activity.[173,174]

Hepatotoxicity

The liver is an essential organ that performs numerous activities, including being the site for the synthesis of blood proteins, such as clotting factors, and detoxification of xenobiotics, toxins, and drugs.[175] Due to its role in toxin metabolism and its sensitivity to environmental pollutants, this organ has been highlighted in toxicological studies related to contamination by organic and inorganic chemical agents.[176]

Toxic substances that cause injury or functional disorders to the liver are called hepatotoxins and are generally related to environmental contamination and pharmaceutical uses, such as metals, persistent organic compounds, hydrocarbons, pesticides, detergents, and drugs.[177] These compounds can be easily absorbed by vertebrates and invertebrates in various ways, such as in breathing or feeding, and in addition to bioaccumulation in organs and tissues, they can generate metabolic and enzymatic variations.[178] Among the liver changes caused in the presence of toxic substances, zonal necrosis, hepatitis, cholestasis, steatosis, granuloma and even neoplasia stand out.[179]

The zebrafish is a promising model for the evaluation of hepatotoxicity mechanisms and has been widely used in studies of environmental contaminants and the pharmaceutical industry as well as in research related to behavioral biology[180], pharmacology[181], and toxicology.[182] More sensitive liver toxicity studies generally use *in vivo* tests, as they allow the study of sample toxicity within the physiology of an entire organism. [183] Furthermore, transparency provides an advantage in detecting and monitoring developmental changes, and organ differentiation, which makes them accurate models for hepatotoxicity research.[184]

The zebrafish liver has every cell type that the mammalian liver possesses, except for Kupffer cells, which are hepatic immune cells. However, it performs essential functions such as glycogen storage, metabolism of xenobiotic, and secretion of bile and serum proteins. In this way, it performs the same functions as the human liver.[185] It is fully functional at only 5 dpf, allowing the *in vitro* study of fish larvae in hepatotoxicity assays.[186]

In a work using zebrafish larvae, the hepatotoxicity of six hepatotoxic drugs in mammals and two non-hepatotoxic compounds was evaluated, considering specific hepatotoxic activities, such as degeneration and alteration of liver size, or retention of the yolk sac. The work showed that all hepatotoxic drugs in mammals induced hepatic degeneration, reduced liver size and delayed yolk sac absorption in zebrafish, while non-hepatotoxic drugs did not generate adverse effects, presenting a similar rate of results when compared to those in mammals, highlighting the zebrafish as a successful model in the overall prediction for hepatotoxic drugs.[175]

There are various methods for evaluating hepatic toxicity in zebrafish, such as the visual assessment of macroscopic and microscopic morphological changes, in addition to enzymatic tests, hepatic excretion, and chemical evaluation of liver constituents.[187] Antioxidant enzymes can be increased or decreased under chemical stress, being essential for the conversion of ROS into harmless metabolites.[188] The increase in reactive oxygen species (ROS) and the excessive accumulation of antioxidant enzymes are associated with oxidative stress in aquatic organisms, which negatively affects macromolecules such as lipids, proteins, and nucleic acids. Furthermore, it influences the imbalance between oxidation and the antioxidant system, resulting in excessive oxidation.[189]

Some authors demonstrated a significant increase in the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in the liver of male and female fish exposed to the fungicide tebuconazole.[189] The pesticide thiophanate-methyl also showed hepatotoxicity in *D. rerio* and induced disturbances in liver metabolism by activating caspase-3 and oxidative stress. The authors mention the gradual accumulation of ROS and the increased activity of catalase and superoxide dismutase in the groups exposed to the contaminant.[190] Additionally, hepatotoxicity was reported in zebrafish larvae exposed to the pollutant

fraxinellone. The results showed that at the highest concentrations, ROS levels were tripled in comparison to the control.[191]

A study evaluating the potential toxic effect of microplastics on zebrafish found that after seven days of exposure the compound accumulated in their livers. A histopathological analysis showed that the microplastics caused an inflammation and accumulation of lipids in the animals' livers, in addition to a significant increase in the activity of catalase and superoxide dismutase enzymes, indicating oxidative stress[192]. The metabolic evaluation suggested changes in the hepatic, lipid, and energy metabolism of the zebrafish.[132] Long-term exposure of the broad-spectrum fungicide, Flutolanil was also studied using zebrafish as a study model. In this work, fish were exposed to different concentrations of the chemical (0, 0.25, 50, and 1000 µg/L). The results obtained on hepatotoxicity showed that catalase activity fell in all groups treated with the compound and some pathological changes in the liver occurred, including hepatic vacuolization.[193]

Nephrotoxicity

The kidney is an important excretory and regulatory organ; it becomes therefore particularly vulnerable to xenobiotic activity. Once it undergoes changes, it is unable to perform its main function, namely, removing toxic molecules from the circulation. It has a very complex anatomic composition and a great variety of cell populations. In mammals, for example, the kidney has more than 20 cell population types, including epithelial and mesenchymal cells.[182] Due to the many important functions performed by this organ, monitoring biomarkers that indicate kidney failure and histopathological aspects have become popular among toxicological bioassays.[194]

Since the zebrafish is a freshwater species, the main function of its kidney is water excretion and osmoregulation. Even so, the similarities between zebrafish and mammal kidneys make the former an excellent experimental model for renal research, being mostly used for investigations of glomerular filtration and renal tubule evaluations on both larvae and adult phases.[195] A study showed that microcystin-LR (MCLR) induced nephrotoxicity in adult zebrafish. After a 60-day exposure to different concentrations of MCLR (0, 1, 5, and 25 µg/L), histopathological lesions such as renal tubules filled with eosinophilic casts,

abnormal renal tubules, intertubular space decrease, and blood infiltration in renal cells were observed.[196] When investigating the nephrotoxicity of acetaminophen (n-acetyl-para-aminophenol, paracetamol) in zebrafish embryos at different developmental stages, researchers showed that between the control group and acetaminophen-exposure group (2.25 mM), no morphological changes were observed in zebrafish kidneys. However, after exposure to higher dosages (22.5 and 45 mM), the kidneys showed signs of malformation, such as a curved and cystic pronephric tube, pronephric duct, and cystic and atrophic glomerulus. The authors concluded that malformed kidney phenotypes are dose-dependent.[197]

In mammals, the kidney develops in three stages. The first occurs in the organ's embryonic stage, the pronephros, which is characterized by having a pair of glomeruli. Then the pronephros is replaced by the mesonephros which is later replaced by the adult kidney. In fish, the kidney ceases developing with the formation of the mesonephros.[198] The cell types presented in zebrafish pronephros (larval stage), and mesonephros (juvenile and adult stage) are analogous to those found in higher vertebrates. Therefore, they are considered a good model for studies of renal function and the damage induced by drugs and xenobiotics, in addition to research involving renal cell regeneration.[199] Despite the simpler anatomy of zebrafish compared to mammals, the similarities between cellular constitution, fish pronephros function, and mammalian metanephros make zebrafish attractive for research on renal function.[200]

Aristolochic acid (AA), a compound used in phytotherapy drugs, induced damage in zebrafish kidneys. It was observed that at 15 days post-fertilization exposed for eight days to 0.5 μM AA, zebrafish kidneys showed clear signs of acute injury, which led to a loss of function in the glomerular filtration barrier.[151] A studied that approached the nephroprotective effects of resveratrol and ursolic acid, demonstrated that those substances can attenuate the AA-induced malformations, concluding that zebrafish are an efficient model for assessing nephroprotective compounds.[151] Other studies on zebrafish kidneys addresses their regenerative characteristics, including the ability to replace epithelial populations after acute injury and to develop new renal functional units called nephrons.[201]

Endocrine system disruptions

In recent times, a significant increase has been noted in deviations from normal physiological development and in the incidence of rare diseases[202], which may be triggered by endocrine system disruption, leading to negative effects, as the individual is exposed to substances known as endocrine disruptors (EDs).[203] According to the U.S. Environmental Protection Agency, endocrine disruptors are exogenous chemicals that can interfere with the homeostasis of natural hormone synthesis, secretion, transport, binding, and elimination of the organism.[204,205]

These persistent organic pollutants are heterogeneous and may be classified as natural or synthetic. Among the best known synthetic EDs are polychlorinated biphenyls, polybrominated biphenyls, bisphenols, benzophenone phenols, polychlorinated and polychlorinated aromatic hydrocarbons, industrial EDs, plastics, pesticides, fungicides, cyclic synthetics, and chemical and household products.[206–209]

The excretion of crude endocrine-disrupting compounds and their metabolites in water and sewage treatment plants may be the main route of contamination of water resources.[210] Studies show that even after all the stages of wastewater treatment, ED agents of the estrogen class and others can be detected in the final product, due to the inefficiency of their removal during treatment.[211,212]

The contact of fish with the abovementioned ED hormones can lead to hormonal imbalances that affect testicular growth, reproductive anomalies, feminization of male fish, and consequent reduction of population.[213] Additionally, such substances have a bioaccumulative potential and can reach the fish in two different ways: direct participation through inhalation exposure or via the diet through trophic transfer.[214]

Zebrafish have been one of the most utilized aquatic bioindicators to perform toxicity tests that evaluate the effect of endocrine-disrupting compounds, due to their useful characteristics as a biological model.[215] The polycyclic aromatic hydrocarbon Benzo(a)pyrene induces mortality and the premature hatching of zebrafish. Polychlorinated hydrocarbons also generate harmful effects on the species, among which 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) stands out.[216] According to one study, malformations and increased mortality were identified in the subsequent offspring of zebrafish fish during an embryogenesis experiment.

Deformities were also observed in the cranial and axial skeleton during the adult phase, and failures in reproduction, with a clear decrease in egg production and feminization of the population, where fish with distinctly feminine aspects carried testes instead of ovaries.[217]

Short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) can negatively influence gene expression by altering the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and thyroid hormone levels.[218] Heavy metals can also act as endocrine disruptors in *D. rerio*: exposure metals generate behavioral dysfunctions in the species, such as more frequent ascents to the water surface, an increase in the percentage and intensity of tremors, and erratic movements.[219]

Bisphenol A (BPA) is a potential ED, used commercially for the manufacture of epoxy resin and polycarbonate plastics; therefore, ecotoxicological tests are extremely important for assessing their effects on organisms. The exposure of *D. rerio* to three different concentrations of BPA for 15 days demonstrated both a reduction in global DNA methylation and in the expression of the enzyme DNA methyltransferase 1 (DNMT1), besides interrupting stages of the fish reproductive processes.[220] As well as interfering in these processes, BPA induced a significant increase in the production of reactive oxygen species and lipid peroxidation, resulting in disturbances in membrane fluidity, in addition to the loss of its mitochondrial integrity and functionality.[221]

Conclusions and future perspectives

The global acceptance of *D. rerio* as a modern experimental animal model is increasing gradually. As has been seen, the use of zebrafish has recently been elucidating fundamental biological processes in an interdisciplinary manner, covering several areas of study, particularly toxicology and biomedical research, throughout both their adult and embryo-larval stages.

In this literature review, we highlighted the progress of the species' scientific applicability in the field of environmental toxicology. The studies discussed here are related to its response to exposure to different xenobiotics, involving experiments with the embryonic, larval, and adult stages of zebrafish. This demonstrates the efficiency of this animal model as a tool in ecotoxicological tests, due to the increasingly sophisticated methodologies being developed to elucidate the cause and effect of environmental contaminants.

The future is promising for zebrafish in animal experimentation, and it is believed that their use will increase in the coming years. New lines of research promise scientific advancements with the species, especially in the assessment of the adverse effects of environmental contaminants. As an example, we can consider the improvement of omics techniques (genomics, proteomics, and metabolomics), as well as the use of mathematical and computational models in toxicological analyses.

The zebrafish, especially the embryo and larvae will become an increasingly routine as high throughput screening (HTS) of small molecules and drug libraries in the discovery process of promising new therapeutics. Besides this, a 'safe-by-design' approach should be established using zebrafish, which presuppose the synthesis of safe substances after modifying their toxic properties. Therefore, with contemporary technology together with innovation through emerging technologies, we can predict that many knowledge gaps will certainly be bridged with advances in research using *D. rerio* as an animal model. The present review provides an insight into the current status of ecotoxicological knowledge obtained through zebrafish bioassays. The data presented also show the need for a comprehensive future ecotoxicological assessment with this model. This information will assist in inferring the potential effects of xenobiotics and predicting their potential risks to the aquatic ecosystem.

Acknowledgements
We thank Tiago Rosa de Souza for illustrating Graphical abstract and Figure 1.

Authors' contributions

Author 1: responsible for writing abstract, introduction and embryotoxicity, and for reviewing and editing the manuscript. **Author 2**: wrote about neurotoxicity and cardiotoxicity. **Author 3**: wrote the section on genotoxicity and epigenetics. **Author 4**: contributed to the writing on immunotoxicity. **Author 5**: wrote about endocrine disruptors. **Author 6**: wrote about the topics of nephrotoxicity and hepatotoxicity. **Authors 7 and 8**: acted in the supervision, conceptualization, writing, and revision of the entire manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding
No funding was received for conducting this study.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

References

1. Häder DP, Banaszak AT, Villafañe VE, et al. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. Sci Total Environ 2020;713:136586; doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136586.

2. Rahman Z. An overview on heavy metal resistant microorganisms for simultaneous treatment of multiple chemical pollutants at co-contaminated sites, and their multipurpose application. J Hazard Mater 2020;396(April):122682; doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122682.

3. da Conceição AA, Albertoni EF, Milesi SV, et al. Influence of Anthropic Impacts on the Functional Structure of Aquatic Invertebrates in Subtropical Wetlands. Wetlands 2020; doi: 10.1007/s13157-020-01317-1.

4. Suzuki T, Hidaka T, Kumagai Y, et al. Environmental pollutants and the immune response. Nat Immunol 2020; doi: 10.1038/s41590-020-0802-6.

5. Donkadokula NY, Kola AK, Naz I, et al. A review on advanced physico-chemical and biological textile dye wastewater treatment techniques. Rev Environ Sci Biotechnol 2020;19(3):543–560; doi: 10.1007/s11157-020-09543-z.

6. Magalhães D de P, Ferrão-Filho A da S. a Ecotoxicologia Como Ferramenta No Biomonitoramento De Ecossistemas Aquáticos. Oecologia Aust 2008;12(03):355–381; doi: 10.4257/oeco.2008.1203.02.

7. Bub S, Wolfram J, Stehle S, et al. Graphing ecotoxicology: The MAGIC graph for linking environmental data on chemicals. Data 2019;4(1):1–17; doi: 10.3390/data4010034.

8. Brooks W Bryan. Greening Chemistry and Ecotoxicology Towards Sustainable Environmental Quality. 2019.

9. Derikvandy A, Pourkhabbaz HR, Banaee M, et al. Genotoxicity and oxidative damage in zebrafish (Danio rerio) after exposure to effluent from ethyl alcohol industry. Chemosphere 2020;251:126609; doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126609.

10. Norberg-King TJ, Embry MR, Belanger SE, et al. An International Perspective on the Tools and Concepts for Effluent Toxicity Assessments in the Context of Animal Alternatives: Reduction in Vertebrate Use. Environ Toxicol Chem 2018;37(11):2745–2757; doi: 10.1002/etc.4259.

11. Ribeiro RX, da Silva Brito R, Pereira AC, et al. Ecotoxicological assessment of effluents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multi-biomarker approach. Sci Total Environ 2020;735:139036; doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139036.

12. Miziara ID, Magalhães AT de M, d'Aparecida Santos M, et al. Research ethics in animal models. Braz J Otorhinolaryngol 2012;78(2):128–131; doi: 10.1590/S1808-86942012000200020.

13. Russell WM., Burch R. Principle of Human Experimental Techniques. 1959.

14. Mel Y De, Perera S, Ratnaweera PB, et al. Novel insights of toxicological evaluation of

herbal medicine : Human based toxicological assays. Asian J Pharm Pharmacol 2017;3(2):41–49.

15. MacArthur Clark J. The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement. Br J Nutr 2018;120(s1):S1–S7; doi: 10.1017/S0007114517002227.

16. Nishimura Y, Inoue A, Sasagawa S, et al. Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. Congenit Anom (Kyoto) 2016;56(1):18–27; doi: 10.1111/cga.12142.

17. Anderson PD, Battle HI. Effects of chloramphenicol on the development of the zebrafish, Brachydanio rerio. Can J Zool 1967;45(2):191–204; doi: 10.1139/z67-026.

18. Pliss GB, Khudoley V V. Tumor induction by carcinogenic agents in aquarium fish. J Natl Cancer Inst 1975;55(1):129–136; doi: 10.1093/jnci/55.1.129.

19. Meyers JR. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. Curr Protoc Essent Lab Tech 2018;16(1):1–26; doi: 10.1002/cpet.19.

20. Freeman JL, Weber GJ, Sepúlveda MS. Fishing for microRNAs in Toxicology. microRNAs Toxicol Med 2013;49–75; doi: 10.1002/9781118695999.ch4.

21. Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature 2013;496(7446):498–503; doi: 10.1038/nature12111.

22. Tal T, Yaghoobi B, Lein PJ. Translational toxicology in zebrafish. Curr Opin Toxicol 2020;23–24:56–66; doi: 10.1016/j.cotox.2020.05.004.

23. Malafaia G, de Souza AM, Pereira AC, et al. Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems. Sci Total Environ 2020;700:134867; doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134867.

24. Beekhuijzen M, de Koning C, Flores-Guillén ME, et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. Reprod Toxicol 2015;56:64–76; doi: 10.1016/j.reprotox.2015.06.050.

25. MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. Nat Rev Drug Discov 2015;14(10):721–731; doi: 10.1038/nrd4627.

26. Falcão MAP, de Souza LS, Dolabella SS, et al. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. Environ Sci Pollut Res 2018;25(35):35015–35026; doi: 10.1007/s11356-018-3399-7.

27. Wigh A, Aït-Aïssa S, Creusot N, et al. Assessment of Ozone or Not-Treated Wastewater Ecotoxicity Using Mechanism-Based and Zebrafish Embryo Bioassays. J Environ Prot (Irvine, Calif) 2018;09(04):325–346; doi: 10.4236/jep.2018.94022.

28. Strähle U, Scholz S, Geisler R, et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments-A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. Reprod Toxicol 2012;33(2):128–132; doi: 10.1016/j.reprotox.2011.06.121.

29. Gonçalves ÍFS, Souza TM, Vieira LR, et al. Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. Environ Sci Pollut Res 2020;27(10):10185–10204; doi: 10.1007/s11356-020-07902-5.

30. Ducharme NA, Reif DM, Gustafsson JA, et al. Comparison of toxicity values across

zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. Reprod Toxicol 2015;55:3–10; doi: 10.1016/j.reprotox.2014.09.005.

31. Merola C, Perugini M, Conte A, et al. Embryotoxicity of methylparaben to zebrafish (Danio rerio) early-life stages. Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol 2020;236(May):108792; doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108792.

32. Wlodkowic D, Campana O. Toward High-Throughput Fish Embryo Toxicity Tests in Aquatic Toxicology. Environ Sci Technol 2021;55(6):3505–3513; doi: 10.1021/acs.est.0c07688.

33. Hill A, Mesens N, Steemans M, et al. Comparisons between in vitro whole cell imaging and in vivo zebrafish-based approaches for identifying potential human hepatotoxicants earlier in pharmaceutical development. Drug Metab Rev 2012;44(1):127–140; doi: 10.3109/03602532.2011.645578.

34. Pereira AC, Gomes T, Ferreira Machado MR, et al. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. Environ Pollut 2019;252:1841–1853; doi: 10.1016/j.envpol.2019.06.100.

35. Cristiano W, Lacchetti I, Mancini L, et al. Promoting zebrafish embryo tool to identify the effects of chemicals in the context of Water Framework Directive monitoring and assessment. Microchem J 2019;149(June):104035; doi: 10.1016/j.microc.2019.104035.

36. Shen R, Yu Y, Lan R, et al. The cardiovascular toxicity induced by high doses of gatifloxacin and ciprofloxacin in zebrafish. Environ Pollut 2019;254; doi: 10.1016/j.envpol.2019.07.029.

37. Bai C, Tang M. Toxicological study of metal and metal oxide nanoparticles in zebrafish. J Appl Toxicol 2020;40(1):37–63; doi: 10.1002/jat.3910.

38. Bhagat J, Zang L, Nishimura N, et al. Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. Sci Total Environ 2020;728:138707; doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138707.

39. Moon WK, Atique U, An KG. “Ecological risk assessments and eco-toxicity analyses using chemical, biological, physiological responses, DNA damages and gene-level biomarkers in Zebrafish (Danio rerio) in an urban stream.” Chemosphere 2020;239:124754; doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124754.

40. Qiao K, Fu W, Jiang Y, et al. QSAR models for the acute toxicity of 1,2,4-triazole fungicides to zebrafish (Danio rerio) embryos. Environ Pollut 2020;265:114837; doi: 10.1016/j.envpol.2020.114837.

41. Johann S, Nüßer L, Goßen M, et al. Differences in biomarker and behavioral responses to native and chemically dispersed crude and refined fossil oils in zebrafish early life stages. Sci Total Environ 2020;709; doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.136174.

42. Babić S, Barišić J, Stipaničev D, et al. Assessment of river sediment toxicity: Combining empirical zebrafish embryotoxicity testing with in silico toxicity characterization. Sci Total Environ 2018;643:435–450; doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.124.

43. Park H, Lee JY, Park S, et al. Developmental toxicity of fipronil in early development of zebrafish (Danio rerio) larvae: Disrupted vascular formation with angiogenic failure and inhibited neurogenesis. J Hazard Mater 2020;385(October 2019):121531; doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121531.

44. Lee JY, Park S, Lim W, et al. Orbencarb induces lethality and organ malformation in zebrafish embryos during development. Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol 2020;233(April):108771; doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108771.

45. Chen ZY, Li NJ, Cheng FY, et al. The effect of the chorion on size-dependent acute toxicity and underlying mechanisms of amine-modified silver nanoparticles in zebrafish embryos. Int J Mol Sci 2020;21(8); doi: 10.3390/ijms21082864.

46. Hansjosten I, Takamiya M, Rapp J, et al. Surface functionalisation-dependent adverse effects of metal nanoparticles and nanoplastics in zebrafish embryos. Environ Sci Nano 2022;9(1):375–392; doi: 10.1039/d1en00299f.

47. Duan Z, Duan X, Zhao S, et al. Barrier function of zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development. J Hazard Mater 2020;395(January):122621; doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122621.

48. Henn K, Braunbeck T. Dechorionation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio). Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol 2011;153(1):91–98; doi: 10.1016/j.cbpc.2010.09.003.

49. Karas BF, Hotz JM, Buckley BT, et al. Cisplatin alkylating activity in zebrafish causes resistance to chorionic degradation and inhibition of osteogenesis. Aquat Toxicol 2020;229(August):105656; doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105656.

50. Tran CM, Lee H, Lee B, et al. Effects of the chorion on the developmental toxicity of organophosphate esters in zebrafish embryos. J Hazard Mater 2021;401(July 2020):123389; doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123389.

51. Mandrell D, Truong L, Jephson C, et al. Automated zebrafish chorion removal and single embryo placement: Optimizing Throughput of zebrafish developmental toxicity screens. J Lab Autom 2012;17(1):66–74; doi: 10.1177/2211068211432197.

52. Stine JS, Harper BJ, Conner CG, et al. In vivo toxicity assessment of chitosan-coated lignin nanoparticles in embryonic zebrafish (Danio rerio). Nanomaterials 2021;11(1):1–12; doi: 10.3390/nano11010111.

53. Jin Y, Zheng S, Fu Z. Embryonic exposure to cypermethrin induces apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (Danio rerio). Fish Shellfish Immunol 2011;30(4–5):1049–1054; doi: 10.1016/j.fsi.2011.02.001.

54. Jin Y, Liu Z, Liu F, et al. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (Danio rerio). Neurotoxicol Teratol 2015;48:9–17; doi: 10.1016/j.ntt.2015.01.002.

55. Chen M, Yin J, Liang Y, et al. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. Aquat Toxicol 2016;174:54–60; doi: 10.1016/j.aquatox.2016.02.015.

56. Liu Z, Fu Z, Jin Y. Immunotoxic effects of atrazine and its main metabolites at environmental relevant concentrations on larval zebrafish (Danio rerio). Chemosphere 2017;166:212–220; doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.100.

57. Robertson AL, Holmes GR, Bojarczuk AN, et al. A Zebrafish Compound Screen Reveals Modulation of Neutrophil Reverse Migration as an Anti-Inflammatory Mechanism. 2014;6(225).

58. Jault C, Pichon L, Chluba J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in Danio rerio ☪. Mol Immunol 2004;40:759–771; doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.001.

59. Mezouar S, Chantran Y, Michel J, et al. Microbiome and the immune system: From a healthy steady-state to allergy associated disruption. Hum Microbiome J 2018;10(October):11–20; doi: 10.1016/j.humic.2018.10.001.

60. Tu W, Niu L, Liu W, et al. Embryonic exposure to butachlor in zebrafish (Danio rerio): Endocrine disruption, developmental toxicity and immunotoxicity. Ecotoxicol Environ Saf

2013;89:189–195; doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.11.031.

61. Corvi R, Madia F. In vitro genotoxicity testing–Can the performance be enhanced? Food Chem Toxicol 2017;106:600–608; doi: 10.1016/j.fct.2016.08.024.

62. Turkez H, Arslan ME, Ozdemir O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2017;13(10):1089–1098; doi: 10.1080/17425255.2017.1375097.

63. Cotelle S, Férard JF. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. Environ Mol Mutagen 1999;34(4):246–255; doi: 10.1002/(SICI)1098-2280(1999)34:4<246::AID-EM4>3.0.CO;2-V.

64. Babić S, Barišić J, Višić H, et al. Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. Water Res 2017;115:9–21; doi: 10.1016/j.watres.2017.02.049.

65. Rocco L, Izzo A, Zito G, et al. Genotoxicity in Zebrafish (Danio rerio) Exposed to two Pharmacological Products from an Impacted Italian River. J Environ Anal Toxicol 2011;01(02); doi: 10.4172/2161-0525.1000103.

66. Han Y, Liu T, Wang J, et al. Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (Danio rerio) livers. Pestic Biochem Physiol 2016;133:13–19; doi: 10.1016/j.pestbp.2016.03.011.

67. Ku-Centurión M, González-Marín B, Calderón-Ezquerro MC, et al. DNA Damage Assessment in Zebrafish Embryos Exposed to Monceren® 250 SC Fungicide Using the Alkaline Comet Assay. Zebrafish 2016;13(5):442–448; doi: 10.1089/zeb.2016.1265.

68. Paravani E V., Simoniello MF, Poletta GL, et al. Cypermethrin induction of DNA damage and oxidative stress in zebrafish gill cells. Ecotoxicol Environ Saf 2019;173(August 2018):1–7; doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.004.

69. Boran H, Şaffak S. Comparison of Dissolved Nickel and Nickel Nanoparticles Toxicity in Larval Zebrafish in Terms of Gene Expression and DNA Damage. Arch Environ Contam Toxicol 2018;74(1):193–202; doi: 10.1007/s00244-017-0468-8.

70. Morozesk M, Franqui LS, Pinheiro FC, et al. Effects of multiwalled carbon nanotubes co-exposure with cadmium on zebrafish cell line: Metal uptake and accumulation, oxidative stress, genotoxicity and cell cycle. Ecotoxicol Environ Saf 2020;202(February):110892; doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110892.

71. Reinardy HC, Syrett JR, Jeffree RA, et al. Cobalt-induced genotoxicity in male zebrafish (Danio rerio), with implications for reproduction and expression of DNA repair genes. Aquat Toxicol 2013;126:224–230; doi: 10.1016/j.aquatox.2012.11.007.

72. Diekmann M, Waldmann P, Schnurstein A, et al. On the relevance of genotoxicity for fish populations II: Genotoxic effects in zebrafish (Danio rerio) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. Aquat Toxicol 2004;68(1):27–37; doi: 10.1016/j.aquatox.2004.01.019.

73. Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, et al. The in vitro MN assay in 2011: Origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. Arch Toxicol 2011;85(8):873–899; doi: 10.1007/s00204-011-0691-4.

74. Shao Y, Xiao H, Di Paolo C, et al. Integrated zebrafish-based tests as an investigation strategy for water quality assessment. Water Res 2019;150:252–260; doi: 10.1016/j.watres.2018.11.039.

75. Gökçe B, Muşmula O, Üçüncü Sİ. Assessment of Genotoxicity of Methyl Parathion in

Zebrafish by Use of the Micronucleus Test. Int J New Technol Res 2016;2(5):49–51.

76. Marins K, Lazzarotto LMV, Boschetti G, et al. Iron and manganese present in underground water promote biochemical, genotoxic, and behavioral alterations in zebrafish (Danio rerio). Environ Sci Pollut Res 2019;26(23):23555–23570; doi: 10.1007/s11356-019-05621-0.

77. Alak G, Özgeriş FB, Yeltekin AÇ, et al. Hematological and Hepatic Effects of Ulexite in Zebrafish. Environ Toxicol Pharmacol 2020;80(September); doi: 10.1016/j.etap.2020.103496.

78. Singulani JL, Pedroso RS, Ribeiro AB, et al. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. Future Microbiol 2018;13(15):1637–1646; doi: 10.2217/fmb-2018-0200.

79. Resendes AS, dos Santos DS, França FM, et al. Acute toxic and genotoxic effects of formalin in Danio rerio (zebrafish). Ecotoxicology 2018;27(10):1379–1386; doi: 10.1007/s10646-018-1993-6.

80. Novak M, Žegura B, Modic B, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of anticancer drug residues and their mixtures in experimental model with zebrafish liver cells. Sci Total Environ 2017;601–602:293–300; doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.115.

81. Castro TFD, Paiva IM, Carvalho AFS, et al. Genotoxicity of spent pot liner as determined with the zebrafish (Danio rerio) experimental model. Environ Sci Pollut Res 2018;25(12):11527–11535; doi: 10.1007/s11356-018-1404-9.

82. Aluru N. Epigenetic effects of environmental chemicals: Insights from zebrafish. Curr Opin Toxicol 2017;6:26–33; doi: 10.1016/j.cotox.2017.07.004.

83. Balasubramanian S, Raghunath A, Perumal E. Role of epigenetics in zebrafish development. Gene 2019;718(May); doi: 10.1016/j.gene.2019.144049.

84. Schlotman KE. An Epigenetic Look at Atrazine Toxicity. J purdue Undergrad Res 2014;4:48–57.

85. Bollati V, Baccarelli A. Environmental epigenetics. Heredity (Edinb) 2010;105(1):105–112; doi: 10.1038/hdy.2010.2.

86. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology 2013;38(1):23–38; doi: 10.1038/npp.2012.112.

87. Kamstra JH, Aleström P, Kooter JM, et al. Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. Environ Sci Pollut Res 2015;22(21):16262–16276; doi: 10.1007/s11356-014-3466-7.

88. Goll MG, Halpern ME. DNA Methylation in Zebrafish. 2011;101:193–218; doi: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00005-6.

89. Olsvik PA, Whatmore P, Penglase SJ, et al. Associations between behavioral effects of bisphenol A and DNA methylation in zebrafish embryos. Front Genet 2019;10(MAR):1–18; doi: 10.3389/fgene.2019.00184.

90. Qian Y, Wang C, Wang J, et al. Fipronil-induced enantioselective developmental toxicity to zebrafish embryo-larvae involves changes in DNA methylation. Sci Rep 2017;7(1):1–11; doi: 10.1038/s41598-017-02255-5.

91. De Souza AP, Planello AC, Marques MR, et al. High-throughput DNA analysis shows the importance of methylation in the control of immune inflammatory gene transcription in chronic periodontitis. Clin Epigenetics 2014;6(1):1–11; doi: 10.1186/1868-7083-6-15.

92. Hu J, Liu J, Li J, et al. Metal contamination , bioaccumulation , ROS generation , and epigenotoxicity influences on zebrafish exposed to river water polluted by mining activities. J Hazard Mater 2021;405(September 2020):124150; doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124150.

93. Carvan MJ, Kalluvila TA, Klingler RH, et al. Mercury-induced epigenetic transgenerational inheritance of abnormal neurobehavior is correlated with sperm epimutations in zebrafish. PLoS One 2017;12(5); doi: 10.1371/journal.pone.0176155.

94. Knecht AL, Truong L, Marvel SW, et al. Transgenerational inheritance of neurobehavioral and physiological deficits from developmental exposure to benzo[a]pyrene in zebrafish. Toxicol Appl Pharmacol 2017;329:148–157; doi: 10.1016/j.taap.2017.05.033.

95. Mudbhary R, Sadler KC. Epigenetics, development, and cancer: Zebrafish make their ARK. Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev 2011;93(2):194–203; doi: 10.1002/bdrc.20207.

96. Santangeli S, Maradonna F, Gioacchini G, et al. BPA-Induced Deregulation of Epigenetic Patterns: Effects on Female Zebrafish Reproduction. Sci Rep 2016;6(February):1–11; doi: 10.1038/srep21982.

97. González-Rojo S, Lombó M, Fernández-Díez C, et al. Male exposure to bisphenol a impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. Environ Pollut 2019;248:368–379; doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.127.

98. Valles S, Hernández-Sánchez J, Dipp VR, et al. Exposure to low doses of inorganic arsenic induces transgenerational changes on behavioral and epigenetic markers in zebrafish (Danio rerio). Toxicol Appl Pharmacol 2020;396(April):115002; doi: 10.1016/j.taap.2020.115002.

99. Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. Epigenetics 2014;9(1):3–12; doi: 10.4161/epi.27473.

100. Cao M, Song F, Yang X, et al. Identification of Potential Long Noncoding RNA Biomarker of Mercury Compounds in Zebrafish Embryos. Chem Res Toxicol 2019;32(5):878–886; doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00029.

101. Pappalardo-carter DL, Balaraman S, Sathyan P, et al. Suppression and Epigenetic Regulation of MiR-9 Contributes to Ethanol Teratology : Evidence from Zebrafish and Murine Fetal Neural Stem Cell Models. Alcohol ANDEXPERIMENTALRESEARCH 2013;37(10):1657–1667; doi: 10.1111/acer.12139.

102. Chi NC, Bussen M, Brand-Arzamendi K, et al. Cardiac conduction is required to preserve cardiac chamber morphology. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107(33):14662–14667; doi: 10.1073/pnas.0909432107.

103. Mickoleit M, Schmid B, Weber M, et al. High-resolution reconstruction of the beating zebrafish heart. Nat Methods 2014;11(9):919–922; doi: 10.1038/nmeth.3037.

104. Reischauer S, Arnaout R, Ramadass R, et al. Actin binding GFP allows 4D in vivo imaging of myofilament dynamics in the zebrafish heart and the identification of ErBB2 signaling as a remodeling factor of myofibril architecture. Circ Res 2014;115(10):845–856; doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304356.

105. Thisse C, Zon LI. Organogenesis - Heart and blood formation from the zebrafish point of view. Science (80-) 2002;295(5554):457–462; doi: 10.1126/science.1063654.

106. McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity.

Drug Discov Today 2008;13(9–10):394–401; doi: 10.1016/j.drudis.2008.03.002.

107. Langheinrich U. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. BioEssays 2003;25(9):904–912; doi: 10.1002/bies.10326.

108. Arnaout R, Ferrer T, Huisken J, et al. Zebrafish model for human long QT syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(27):11316–11321; doi: 10.1073/pnas.0702724104.

109. Brette F, Luxan G, Cros C, et al. Characterization of isolated ventricular myocytes from adult zebrafish (Danio rerio). Biochem Biophys Res Commun 2008;374(1):143–146; doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.109.

110. Chan PK, Lin CC, Cheng SH. Noninvasive technique for measurement of heartbeat regularity in zebrafish (Danio rerio) embryos. BMC Biotechnol 2009;9:1–10; doi: 10.1186/1472-6750-9-11.

111. Zhu JJ, Xu YQ, He JH, et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. J Appl Toxicol 2014;34(2):139–148; doi: 10.1002/jat.2843.

112. Genge CE, Lin E, Lee L, et al. The zebrafish heart as a model of mammalian cardiac function. Rev Physiol Biochem Pharmacol 2016;171:99–136; doi: 10.1007/112_2016_5.

113. Giardoglou P, Beis D. On zebrafish disease models and matters of the heart. Biomedicines 2019;7(1); doi: 10.3390/biomedicines7010015.

114. Zakaria ZZ, Benslimane FM, Nasrallah GK, et al. Using Zebrafish for Investigating the Molecular Mechanisms of Drug-Induced Cardiotoxicity. 2018;2018.

115. González-rosa JM. Zebrafish Models of Cardiac Disease : From Fortuitous Mutants to Precision Medicine. 2022;1803–1826; doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.320396.

116. Geoffrey Burns C, Milan DJ, Grande EJ, et al. High-Throughput Assay for Small Molecules That Modulate Zebrafish Embryonic Heart Rate. Nat Chem Biol 2005;1(5):263–264; doi: 10.1038/nchembio732.

117. Granato M, Van Eeden FJM, Schach U, et al. Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. Development 1996;123:399–413; doi: 10.1242/dev.123.1.399.

118. Tessadori F, van Weerd JH, Burkhard SB, et al. Identification and Functional Characterization of Cardiac Pacemaker Cells in Zebrafish. PLoS One 2012;7(10):1–9; doi: 10.1371/journal.pone.0047644.

119. White RM, Sessa A, Burke C, et al. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. Cell Stem Cell 2008;2(2):183–189; doi: 10.1016/j.stem.2007.11.002.

120. Liu J, Bressan M, Hassel D, et al. A dual role for ErbB2 signaling in cardiac trabeculation. Development 2010;137(22):3867–3875; doi: 10.1242/dev.053736.

121. Meng Y, Zhong K, Xiao J, et al. Exposure to pyrimethanil induces developmental toxicity and cardiotoxicity in zebrafish. Chemosphere 2020;255:126889; doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126889.

122. Ding Y, Liu W, Deng Y, et al. Trapping cardiac recessive mutants via expression-based insertional mutagenesis screening. Circ Res 2013;112(4):606–617; doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300603.

123. Huo Z-R, Marshall L, Zhou W, et al. Zebrafish models of heart development and

cardiovascular diseases. J Perioper Sci Huo al J Perioper Sci 2015;2.

124. Li M, Liu XY, Feng XZ. Cardiovascular toxicity and anxiety-like behavior induced by deltamethrin in zebrafish (Danio rerio) larvae. Chemosphere 2019;219:155–164; doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.011.

125. Saley A, Hess M, Miller K, et al. Cardiac Toxicity of Triclosan in Developing Zebrafish. Zebrafish 2016;13(5):399–404; doi: 10.1089/zeb.2016.1257.

126. Bal-Price AK, Hogberg HT, Buzanska L, et al. Relevance of in vitro neurotoxicity testing for regulatory requirements: Challenges to be considered. Neurotoxicol Teratol 2010;32(1):36–41; doi: 10.1016/j.ntt.2008.12.003.

127. Vargas R, Ponce-Canchihuamán J. Emerging various environmental threats to brain and overview of surveillance system with zebrafish model. Toxicol Reports 2017;4(August):467–473; doi: 10.1016/j.toxrep.2017.08.002.

128. Horzmann KA, Freeman JL. Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity. 2016.; doi: 10.3390/toxics4030019.

129. Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. Trends Neurosci 2014;37(5):264–278; doi: 10.1016/j.tins.2014.02.011.

130. Durairaj B, Dhanabal M. Zebrafish as a prodigious tool in neuropsychiatric research. J Basic Appl Zool 2020;81(1); doi: 10.1186/s41936-020-00189-5.

131. Kokel D, Bryan J, Laggner C, et al. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. Nat Chem Biol 2010;6(3):231–237; doi: 10.1038/nchembio.307.

132. Lu ZG, Li MH, Wang JS, et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine, in zebrafish (Danio rerio) embryos/larvae. Reprod Toxicol 2014;47:33–41; doi: 10.1016/j.reprotox.2014.05.015.

133. Basnet RM, Zizioli D, Taweedet S, et al. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. Biomedicines 2019;7(1); doi: 10.3390/BIOMEDICINES7010023.

134. Kristofco LA, Cruz LC, Haddad SP, et al. Age matters: Developmental stage of Danio rerio larvae influences photomotor response thresholds to diazinion or diphenhydramine. Aquat Toxicol 2016;170:344–354; doi: 10.1016/j.aquatox.2015.09.011.

135. Monroe JD, Manning DP, Uribe PM, et al. Hearing sensitivity differs between zebrafish lines used in auditory research. Hear Res 2016;341:220–231; doi: 10.1016/j.heares.2016.09.004.

136. Glazer L, Wells CN, Drastal M, et al. Developmental exposure to low concentrations of two brominated flame retardants, BDE-47 and BDE-99, causes life-long behavioral alterations in zebrafish. Neurotoxicology 2018;66:221–232; doi: 10.1016/j.neuro.2017.09.007.

137. Christou M, Kavaliauskis A, Ropstad E, et al. DMSO effects larval zebrafish (Danio rerio) behavior, with additive and interaction effects when combined with positive controls. Sci Total Environ 2020;709:134490; doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134490.

138. Ling Y, Sun L, Wang D, et al. Triclosan induces zebrafish neurotoxicity by abnormal expression of miR-219 targeting oligodendrocyte differentiation of central nervous system. Arch Toxicol 2020;94(3):857–871; doi: 10.1007/s00204-020-02661-1.

139. Petersen BD, Bertoncello KT, Bonan CD. Standardizing Zebrafish Behavioral Paradigms Across Life Stages: An Effort Towards Translational Pharmacology. Front Pharmacol

2022;13(January):1–7; doi: 10.3389/fphar.2022.833227.

140. Cao Z, Su M, Wang H, et al. Carboxyl graphene oxide nanoparticles induce neurodevelopmental defects and locomotor disorders in zebrafish larvae. Chemosphere 2021;270:128611; doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128611.

141. Gundlach M, Di Paolo C, Chen Q, et al. Clozapine modulation of zebrafish swimming behavior and gene expression as a case study to investigate effects of atypical drugs on aquatic organisms. Sci Total Environ 2022;815:152621; doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152621.

142. Fan B, Dai L, Liu C, et al. Nano-TiO2 aggravates bioaccumulation and developmental neurotoxicity of triphenyl phosphate in zebrafish larvae. Chemosphere 2022;287:132161; doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132161.

143. Norton WHJ, Manceau L, Reichmann F. Chapter 8 Technique to Measure Social Behavior and Behavioral. 2019;2011.

144. Nunes AR, Carreira L, Anbalagan S, et al. Perceptual mechanisms of social affiliation in zebrafish. Sci Rep 2020;10(1):1–14; doi: 10.1038/s41598-020-60154-8.

145. Ogi A, Licitra R, Naef V, et al. Social Preference Tests in Zebrafish: A Systematic Review. Front Vet Sci 2021;7(January); doi: 10.3389/fvets.2020.590057.

146. Moreira ALP, Luchiari AC. Effects of oxybenzone on zebrafish behavior and cognition. Sci Total Environ 2022;808; doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152101.

147. Schnörr SJ, Steenbergen PJ, Richardson MK, et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. Behav Brain Res 2012;228(2):367–374; doi: 10.1016/j.bbr.2011.12.016.

148. Varga ZK, Zsigmond Á, Pejtsik D, et al. The swimming plus-maze test: a novel high-throughput model for assessment of anxiety-related behaviour in larval and juvenile zebrafish (Danio rerio). Sci Rep 2018;8(1):1–11; doi: 10.1038/s41598-018-34989-1.

149. Colwill RM, Creton R. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. Rev Neurosci 2011;22(1):63–73; doi: 10.1515/RNS.2011.008.

150. Massarsky A, Abdel A, Glazer L, et al. Neurobehavioral effects of 1,2-propanediol in zebrafish (Danio rerio). Neurotoxicology 2018;65:111–124; doi: 10.1016/j.neuro.2018.02.007.

151. Wang X, Giusti A, Ny A, et al. Nephrotoxic effects in zebrafish after prolonged exposure to aristolochic acid. Toxins (Basel) 2020;12(4); doi: 10.3390/toxins12040217.

152. Lee J, Freeman JL. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: A mini-review. Neurotoxicology 2014;43:57–64; doi: 10.1016/j.neuro.2014.03.008.

153. Nishimura Y, Murakami S, Ashikawa Y, et al. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. Congenit Anom (Kyoto) 2015;55(1):1–16; doi: 10.1111/cga.12079.

154. Wullimann MF, Mueller T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. J Comp Neurol 2004;475(2):143–162; doi: 10.1002/cne.20183.

155. Wullimann MF. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review. Integr Zool 2009;4(1):123–133; doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00140.x.

156. Mueller T. What is the thalamus in zebrafish? Front Neurosci 2012;6(MAY):1–14; doi:

10.3389/fnins.2012.00064.

157. Wong CED, Hua K, Monis S, et al. Cellular localization of gdnf in adult zebrafish brain. Brain Sci 2020;10(5):1–22; doi: 10.3390/brainsci10050286.

158. Bandmann O, Burton EA. Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. Neurobiol Dis 2010;40(1):58–65; doi: 10.1016/j.nbd.2010.05.017.

159. Fleming A, Diekmann H, Goldsmith P. Functional Characterisation of the Maturation of the Blood-Brain Barrier in Larval Zebrafish. PLoS One 2013;8(10):1–12; doi: 10.1371/journal.pone.0077548.

160. Hitchcock SA, Pennington LD. Structure-brain exposure relationships. J Med Chem 2006;49(26):7559–7583; doi: 10.1021/jm060642i.

161. Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC, et al. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. Brain Res Bull 2008;75(5):619–628; doi: 10.1016/j.brainresbull.2007.10.043.

162. Xie J, Farage E, Sugimoto M, et al. A novel transgenic zebrafish model for blood-brain and blood-retinal barrier development. BMC Dev Biol 2010;10; doi: 10.1186/1471-213X-10-76.

163. Schmidt R, Strähle U, Scholpp S. Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. Neural Dev 2013;8(1):1–13; doi: 10.1186/1749-8104-8-3.

164. Tropepe V, Sive HL. Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism? Genes, Brain Behav 2003;2(5):268–281; doi: 10.1034/j.1601-183X.2003.00038.x.

165. De Esch C, Slieker R, Wolterbeek A, et al. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini review. Neurotoxicol Teratol 2012;34(6):545–553; doi: 10.1016/j.ntt.2012.08.006.

166. Zhang X, Hong Q, Yang L, et al. PCB1254 exposure contributes to the abnormalities of optomotor responses and influence of the photoreceptor cell development in zebrafish larvae. Ecotoxicol Environ Saf 2015;118:133–138; doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.026.

167. Massei R, Hollert H, Krauss M, et al. Toxicity and neurotoxicity profiling of contaminated sediments from Gulf of Bothnia (Sweden): a multi-endpoint assay with Zebrafish embryos. Environ Sci Eur 2019;31(1); doi: 10.1186/s12302-019-0188-y.

168. Volz SN, Hausen J, Nachev M, et al. Short exposure to cadmium disrupts the olfactory system of zebrafish (Danio rerio) – Relating altered gene expression in the olfactory organ to behavioral deficits. Aquat Toxicol 2020;226(October 2019):105555; doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105555.

169. Min TJ, Kim WY, Ha YR, et al. Dexmedetomidine preconditioning attenuates cisplatin-induced ototoxicity in zebrafish. Clin Exp Otorhinolaryngol 2014;7(4):275–280; doi: 10.3342/ceo.2014.7.4.275.

170. Stengel D, Zindler F, Braunbeck T. An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (Danio rerio) embryos. Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol 2017;193:18–29; doi: 10.1016/j.cbpc.2016.11.001.

171. Andersson MÅ, Ek F, Olsson R. Using visual lateralization to model learning and memory in zebrafish larvae. Sci Rep 2015;5:1–7; doi: 10.1038/srep08667.

172. Bailey JM, Oliveri AN, Levin ED. Pharmacological analyses of learning and memory in zebrafish (Danio rerio). Pharmacol Biochem Behav 2015;139:103–111; doi:

10.1016/j.pbb.2015.03.006.

173. Stehr CM, Linbo TL, Incardona JP, et al. The developmental neurotoxicity of fipronil: Notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. Toxicol Sci 2006;92(1):270–278; doi: 10.1093/toxsci/kfj185.

174. Zhu J, Wang C, Gao X, et al. Comparative effects of mercury chloride and methylmercury exposure on early neurodevelopment in zebrafish larvae. RSC Adv 2019;9(19):10766–10775; doi: 10.1039/c9ra00770a.

175. He J, Guo S, Zhu F, et al. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods Original article A zebra fi sh phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. J Pharmacol Toxicol Methods 2013;67:25–32.

176. Dou L, Ono Y, Chen YF, et al. Hepatic Dendritic Cells, the Tolerogenic Liver Environment, and Liver Disease. Semin Liver Dis 2018;38(2):170–180; doi: 10.1055/s-0038-1646949.

177. Awkerman J, Raimondo S, Schmolke A, et al. Health & Ecological Risk Assessment Guidance for Developing Amphibian Population Models for Ecological Risk Assessment. Integr Environ Assess Manag 2020;16(2):223–233; doi: 10.1002/ieam.4215.

178. Santana LMBM, Cavalvante RM. Transformações Metabólicas de Agrotóxicos em Peixes : Uma Revisão. Eletronic J Chem 2016;8(4).

179. Zhang X, Li C, Gong Z. Development of a Convenient In Vivo Hepatotoxin Assay Using a Transgenic Zebrafish Line with Liver-Specific DsRed Expression. 2014.

180. Mervat NH, Mahmoud UM, Mekkawy IA, et al. Hepatotoxic effects of silver nanoparticles on Clarias gariepinus; Biochemical, histopathological, and histochemical studies. Toxicol Reports 2020;7:133–141; doi: 10.1016/j.toxrep.2020.01.002.

181. Cornet C, Calzolari S, Miñana-Prieto R, et al. ZeGlobalTox: An innovative approach to address organ drug toxicity using zebrafish. Int J Mol Sci 2017;18(4):1–19; doi: 10.3390/ijms18040864.

182. Cassar S, Adatto I, Freeman JL, et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. Chem Res Toxicol 2020;33(1):95–118; doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00335.

183. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. Nat Rev Genet 2007;8(5):353–367; doi: 10.1038/nrg2091.

184. Goessling W, Sadler KC. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. Gastroenterology 2015;149(6):1361–1377; doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.034.

185. Anselmo C de S, Sardela VF, de Sousa VP, et al. Zebrafish (Danio rerio): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol 2018;212(June):34–46; doi: 10.1016/j.cbpc.2018.06.005.

186. Teame T, Zhang Z, Ran C, et al. The use of zebrafish (Danio rerio) as biomedical models. Anim Front 2019;9(3):68–77; doi: 10.1093/af/vfz020.

187. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, et al. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. J Nanobiotechnology 2016;14(1):1–13; doi: 10.1186/s12951-016-0217-6.

188. Toni C, Ferreira D, Kreutz LC, et al. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (Cyprinus carpio) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. Chemosphere 2011;83(4):579–584; doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.12.022.

189. Li S, Jiang Y, Sun Q, et al. Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (Danio rerio). Chemosphere 2020;241:125129; doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125129.

190. Jia K, Cheng B, Huang L, et al. Thiophanate-methyl induces severe hepatotoxicity in zebrafish. Chemosphere 2020;248(28):125941; doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.125941.

191. Wang S, Bao J, Li J, et al. Fraxinellone Induces Hepatotoxicity in Zebrafish through Oxidative Stress and the Transporters Pathway. Molecules 2022;27(9); doi: 10.3390/molecules27092647.

192. Lu Y, Zhang Y, Deng Y, et al. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (Danio rerio) and Toxic Effects in Liver. Environ Sci Technol 2016;50(7):4054–4060; doi: 10.1021/acs.est.6b00183.

193. Teng M, Zhou Y, Song M, et al. Chronic Toxic Effects of Flutolanil on the Liver of Zebrafish (Danio rerio). Chem Res Toxicol 2019;32(6):995–1001; doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00300.

194. Kato Y, Tonomura Y, Hanafusa H, et al. Adult Zebrafish Model for Screening Drug-Induced Kidney Injury. Toxicol Sci 2020;174(2):241–253; doi: 10.1093/toxsci/kfaa009.

195. Morales EE, Wingert RA. Zebrafish as a model of kidney disease. Results Probl Cell Differ 2017;60:55–75; doi: 10.1007/978-3-319-51436-9_3.

196. Wang CC, Si LF, Guo SN, et al. Negative effects of acute cadmium on stress defense, immunity, and metal homeostasis in liver of zebrafish: The protective role of environmental zinc dpre-exposure. Chemosphere 2019;222:91–97; doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.111.

197. Peng H, Wang Y, Wen C, et al. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Nephrotoxicity assessments of acetaminophen during zebra fi sh embryogenesis. Comp Biochem Physiol Part C 2010;151(4):480–486; doi: 10.1016/j.cbpc.2010.02.004.

198. Iranmanesh A, Motamedi M. Histopathological Changes of Hepatorenal Toxicity Induced by Gentamicin in Killifish, Aphanius hormuzensis (Aphaniidae) and its Kidney Regeneration Through Nephron Neogenesis. J Ichthyol 2018;58(6):932–938; doi: 10.1134/S0032945218060048.

199. Ding YJ, Sun CY, Wen CC, et al. Nephroprotective role of resveratrol and ursolic acid in aristolochic acid intoxicated zebrafish. Toxins (Basel) 2015;7(1):97–109; doi: 10.3390/toxins7010097.

200. Cheng D, Shami GJ, Morsch M, et al. Ultrastructural Mapping of the Zebrafish Gastrointestinal System as a Basis for Experimental Drug Studies. Biomed Res Int 2016;2016:12–14; doi: 10.1155/2016/8758460.

201. González-Rosa JM, Burns CE, Burns CG. Zebrafish heart regeneration: 15 years of discoveries. Regeneration 2017;4(3):105–123; doi: 10.1002/reg2.83.

202. Sørensen K, Mouritsen A, Aksglaede L, et al. Recent secular trends in pubertal timing: Implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty. Horm Res Paediatr 2012;77(3):137–145; doi: 10.1159/000336325.

203. Schneider M, Pons JL, Labesse G, et al. In silico predictions of endocrine disruptors properties. Endocrinol (United States) 2019;160(11):2709–2716; doi: 10.1210/en.2019-00382.

204. Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disrupters: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environ Health Perspect 1996;104(SUPPL. 4):715–740; doi: 10.1289/ehp.96104s4715.

205. Thomas Zoeller R, Brown TR, Doan LL, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the Endocrine Society. Endocrinology 2012;153(9):4097–4110; doi: 10.1210/en.2012-1422.

206. Caliman FA, Gavrilescu M. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. Clean - Soil, Air, Water 2009;37(4–5):277–303; doi: 10.1002/clen.200900038.

207. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, et al. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. Endocr Rev 2009;30(4):293–342; doi: 10.1210/er.2009-0002.

208. Gore AC, Crews D, Doan LL, et al. Introduction to endocrine disrupting chemicals (edcs) a guide for public interest organizations and policy-makers réf 80 importante sur les polluants et diabete avec une etude epidemio. 2014;(December).

209. Tijani JO, Fatoba OO, Babajide OO, et al. Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. Environ Chem Lett 2016;14(1):27–49; doi: 10.1007/s10311-015-0537-z.

210. Barrios-Estrada C, de Jesús Rostro-Alanis M, Muñoz-Gutiérrez BD, et al. Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. Sci Total Environ 2018;612:1516–1531; doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.013.

211. Combalbert S, Hernandez-Raquet G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. Appl Microbiol Biotechnol 2010;86(6):1671–1692; doi: 10.1007/s00253-010-2547-x.

212. Sun J, Wang J, Zhang R, et al. Comparison of different advanced treatment processes in removing endocrine disruption effects from municipal wastewater secondary effluent. Chemosphere 2017;168:1–9; doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.031.

213. Lozano N, Rice CP, Pagano J, et al. Concentration of organic contaminants in fish and their biological effects in a wastewater-dominated urban stream. Sci Total Environ 2012;420:191–201; doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.12.059.

214. Savoca D, Pace A. Bioaccumulation , Biodistribution , Toxicology and Biomonitoring of Organofluorine Compounds in Aquatic Organisms. 2021.

215. Jiang J, Wang L, Zhang C, et al. Chemosphere Health risks of sulfentrazone exposure during zebrafish embryo-larvae development at environmental concentration. Chemosphere 2022;288(P3):132632; doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132632.

216. Corrales J, Thornton C, White M, et al. Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. Aquat Toxicol 2014;148:16–26; doi: 10.1016/j.aquatox.2013.12.028.

217. Baker TR, Peterson RE, Heideman W. Early dioxin exposure causes toxic effects in adult zebrafish. Toxicol Sci 2013;135(1):241–250; doi: 10.1093/toxsci/kft144.

218. Liu D, Shen L, Tao Y, et al. Alterations in gene expression during sexual differentiation in androgen receptor knockout mice induced by environmental endocrine disruptors. 2015;(13):399–404; doi: 10.3892/ijmm.2014.2015.

219. SANTOS DA dos, KIRSTEN DAL, FIGUEIREDO TB, et al. Behavior As an Early Sign of

Toxicity and Respiratory System Injury Induced By Cadmium in Zebrafish. Atas Saúde Ambient (São 2018;6(2012):16–33.

220. Laing L V., Viana J, Dempster EL, et al. Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (Danio rerio). Epigenetics 2016;11(7):526–538; doi: 10.1080/15592294.2016.1182272.

221. Silveira CR, Varela Junior AS, Corcini CD, et al. Effects of Bisphenol A on redox balance in red blood and sperm cells and spermatic quality in zebrafish Danio rerio. Ecotoxicology 2019;28(8):913–922; doi: 10.1007/s10646-019-02091-5.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo traz importantes informações sobre a contaminação que ocorre em ambientes de cemitérios, sobretudo quanto à toxicidade das aminas biogênicas geradas durante o processo de decomposição cadavérica. De acordo com os resultados obtidos com os diversos bioindicadores e pelos ensaios realizados com as diferentes concentrações das AB CAD e PUT, é possível concluir que:

✓ Para uma análise mais fidedigna dos efeitos tóxicos de uma substância, é importante realizar ensaios toxicológicos com diferentes bioindicadores e biomarcadores. Análises realizadas com organismos de diferentes níveis tróficos e por diferentes ensaios permitem ampliar as possibilidades de extrapolação dos dados de toxicidade para outros organismos de sensibilidade equivalentes, o que acaba contemplando mais elementos da biota do ambiente considerado. Quanto mais informação se tem a respeito de uma substância, maiores são as certezas dos impactos que ela pode causar ao meio ambiente e à saúde humana;

✓CAD e PUT apresentaram diferentes níveis de toxicidade para os bioindicadores testados. Os testes realizados com as aminas isoladas (CAD ou PUT) mostraram que a CAD é mais citogenotóxica que a PUT. Contudo, nos ensaios realizados com as aminas associadas (CAD+ PUT) foi observado aumento de toxidade das aminas, inferindo um efeito tóxico potencializado para as misturas, exceto para *D. magna*;

✓ As AB foram capazes de interferir no índice de germinação e no desenvolvimento da radícula e do hipocótilo de *L. sativa*. Os efeitos ficaram mais severos com o aumento das concentrações (200 – 1000 mg kg^{-1} / solo). Esses resultados comprovam o potencial fitotóxico das AB avaliadas;

✓ Pelos ensaios realizados com o bioindicador *A. cepa,* foram observadas, alterações no índice mitótico e indução de aberrações cromossômicas e nucleares, para as diferentes concentrações avaliadas de CAD e PUT. Os ensaios de alteração cromossômica mostraram que as misturas de CAD e PUT apresentam efeito citogenotóxico e potencial mutagênico potencializado, em relação aos resultados obtidos com as aminas isoladas. O teste mostrou ainda uma ação aneugênica para essas aminas. Os efeitos das concentrações das AB de forma isolada, só foram significativos para CAD, o que corrobora outros

resultados observados no estudo e descritos na literatura, para a maior toxicidade desta amina, em relação a PUT;

✓ Os colêmbolos não apresentaram comportamento de fuga quando expostos à CAD e PUT, mas sim preferência pelos solos contaminados. Contudo, a longo prazo, as AB combinadas, foram capazes de afetar a reprodução destes indivíduos, diminuindo o número total de juvenis, após 28 dias de exposição.

✓ A CAD também apresentou maior efeito sobre a letalidade da espécie *D. magna* (CL_{50} 9,5 mg. L^{-1}), quando comparado à PUT (CL_{50} 36,7 mg. L^{-1}). As associações das aminas avaliadas neste estudo, não potencializaram o efeito tóxico das AB para este organismo.

✓ De forma isolada, a CAD também induziu maior letalidade em *D. rerio* quando comparado à PUT, sendo a CL_{50} 335,5 mg. L^{-1} e CL_{50} 452,6 mg. L^{-1}, respectivamente. A combinação de CAD e PUT foi capaz de interferir no desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish. A embriotoxicidade das aminas foi comprovada pelo atraso da eclosão e aumento de malformações, incluindo deficiência na coluna e formação de edema de pericárdio;

✓ Todos esses efeitos tóxicos detectados para as AB putrefativas, levam a uma preocupação quanto ao potencial toxicológico dos subprodutos da decomposição cadavérica e sobre os efeitos que esses produtos podem desencadear sobre a biota endêmica de solos e águas que recebem esses resíduos. Frente a tudo isso, este estudo traz elementos que comprovam a necessidade urgente de mais estudos, que avaliem os riscos destas substâncias para os ecossistemas impactados e para a saúde pública.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; SOLGI, R. KARAMI-MOHAJERI, S. Nitrosopyrrolidine. **Encyclopedia of Toxicology**, v.3. p. 601-602, 2014. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01147-7

ABIA, A. L. K. et al. Microbial life beyond the grave: 16S rRNA gene-based metagenomic analysis of bacteria diversity and their functional profiles in cemetery environments. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 831–841, 2019.

AFANGIDEH, C. B.; UDOKPOH, U. U. Environmental impact assessment of groundwater pollution within cemetery surroundings. **International Journal of Engineering**, v. 19, n. 51, 2022.

AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DE OLIVEIRA DAVID, J. A. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of Lactuca sativa L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 366–372, 2016.

ALBERTIN, R. M. et al. Análise e identificação dos impactos ambientais da implantação e operação de cemitério vertical Resultados e discussão. p. 112–118, 2013.

ALCÂNTARA, L. A. et al. Contaminação de recursos naturais por necrópoles. **Disciplinarum Scientia | Naturais e Tecnológicas**, v. 11, n. 1, p. 17–28, 2010.

ALJAIBACHI, R.; CALLAGHAN, A. Impact of polystyrene microplastics on Daphnia magna mortality and reproduction in relation to food availability. **PeerJ**, v. 2018, n. 4, 2018.

ANIFOWOSHE, A. T. et al. Evaluation of cytogenotoxic potential and embryotoxicity of KRS-Cauvery River water in zebrafish (Danio rerio). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 233, p. 113320, 2022.

ANNA, D.; KOSIACKA-BECK, E. How to enhance the environmental values of contemporary cemeteries in an urban context. **Sustainability (Switzerland)**, v. 12, n. 6, 2020.

ARAGÃO, F. B. et al. Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through Lactuca sativa bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, n. February, 2021a.

BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. **Amino Acids**, v. 20, n. 3, p. 301–317, 2001.

BAKKER, R. et al. Biomarker development for neonicotinoid exposure in soil under interaction with the synergist piperonyl butoxide in Folsomia candida. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 53, p. 80897–80909, 2022.

BALKAN, O. Burial and Belonging. **Studies in Ethnicity and Nationalism**, v. 15, n. 1, p. 120–134, 2015.

BANDEIRA, F. O. et al. Effect of temperature on the toxicity of imidacloprid to Eisenia andrei and Folsomia candida in tropical soils. **Environmental Pollution**, v. 267, 2020.

BATISTA, F. S. et al. Geo-Environmental Assessment and Quality of Groundwater in the Complex of Cemiteries: Quinta Dos Lázaros Salvador, Bahia, Brazil. **International Journal of Human Sciences Research**, v. 2, n. 8, p. 2–25, 2022.

BAUM, C. A. et al. Contamination of groundwater by necro-leachate and the influence of the intervening factors in cemeteries of the municipality of Lages – Brazil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 27, n. 4, p. 683–692, 2022.

BELAID, C.; SBARTAI, I. **Assessing the effects of Thiram to oxidative stress responses in a freshwater bioindicator cladoceran (Daphnia magna)**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2021. v. 268

BHAGAT, J.; NISHIMURA, N.; SHIMADA, Y. Worming into a robust model to unravel the micro/nanoplastic toxicity in soil: A review on Caenorhabditis elegans. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 138, p. 116235, 2021.

BORN, C. M. Avaliação dos aspectos construtivos e vulnerabilidade das águas subterrâneas em áreas de cemitérios municipais de Curitiba (Paraná) Constructive aspects and vulnerability of groundwater in municipal cemeteries areas in Curitiba (Paraná). **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, 2014.

BOWLEY, G. et al. Zebrafish as a tractable model of human cardiovascular disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 5, p. 900–917, 2022.

CALMON, M. Forensic Science International : Reports Considerations of coronavirus (COVID-19) impact and the management of the dead in Brazil. **Forensic Science International: Reports**, n. April, p. 100110, 2020.

CAMPOS-SÁNCHEZ, J. C.; ESTEBAN, M. Á. Review of inflammation in fish and value of the zebrafish model. **Journal of Fish Diseases**, v. 44, n. 2, p. 123–139, 2021.

CANNING, L.; SZMIGIN, I. Death and disposal: The universal, environmental dilemma. **Journal of Marketing Management**, v. 26, n. 11–12, p. 1129–1142, 2010.

CAUDURO, F.; MÜLLER, C. R.; RICARDO, G. DA S. Problem of brazilian cemeteries and environment – review of studies. **Holos Environment**, v. 19, p. 1–30, 2019.

CECCONELLO, S. T.; CENTENO, L. N.; SIQUEIRA, T. M. As necrópoles e seus impactos ambientais: um estudo de caso do cemitério São Lucas, Pelotas/RS. n. 2015, p. 110–130, 2019.

CHENG, W.; SUN, D. W.; CHENG, J. H. Pork biogenic amine index (BAI) determination based on chemometric analysis of hyperspectral imaging data. **Lwt**, v. 73, p. 13–19, 2016.

CHOI, T. Y. et al. Zebrafish as an animal model for biomedical research. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 53, n. 3, p. 310–317, 2021.

CLAYDEN, A.; DIXON, K. Woodland burial: Memorial arboretum versus natural native woodland? **Mortality**, v. 12, n. 3, p. 240–260, 2007.

COCKLE, D. L.; BELL, L. S. The environmental variables that impact human decomposition in terrestrially exposed contexts within Canada. **Science and Justice**, v. 57, n. 2, p. 107–117, 2017.

COSTA, J. S. DA et al. Water, sanitation and the COVID-19 in the Amazon. **Holos**, v. 8, p. 1–23, 2020.

CRISANTO-PERRAZO, T. et al. Determination of Empirical Environmental Indices for the Location of Cemeteries—An Innovative Proposal for Worldwide Use. **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 10, 2022.

DAS, A.; KONIETZKO, J.; BOCKEN, N. How do companies measure and forecast environmental impacts when experimenting with circular business models? **Sustainable Production and Consumption**, v. 29, p. 273–285, 2022.

DE LIMA E SILVA, C. et al. Toxicity in Neonicotinoids to Folsima candida and Eisenia andrei. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 548–555, 2020.

DEL RIO, B. et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

DEL RIO, B. et al. The biogenic amine tryptamine, unlike β-phenylethylamine, shows in vitro

cytotoxicity at concentrations that have been found in foods. **Food Chemistry**, v. 331, n. June, p. 127303, 2020.

DENT, B. B.; FORBES, S. L.; STUART, B. H. Review of human decomposition processes in soil. **Environmental Geology**, v. 45, n. 4, p. 576–585, 2004.

DOEUN, D.; SHIN, H. S.; CHUNG, M. S. Effects of storage temperatures, vacuum packaging, and high hydrostatic pressure treatment on the formation of biogenic amines in Gwamegi. **Applied Biological Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 51–58, 2016.

DONATO, F. et al. All ptomaines fault! The strange story of the cadaveric alkaloids, from forensic medicine to molecular biology passing through the asylum. **Medicina Historica**, v. 6, n. 1, 2022.

ESTRIN-SERLUI, T.; OSBORN, M. Putrefaction in the pandemic: a comparative study of the frequency of advanced decomposition change in coronial autopsies since the start of the COVID-19 pandemic. **Journal of Clinical Pathology**, p. jclinpath-2021-207675, 2021.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of Allium cepa exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FITZGERALD, J. A. et al. Approaches to Test the Neurotoxicity of Environmental Contaminants in the Zebrafish Model: From Behavior to Molecular Mechanisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 989–1006, 2021.

FORBES, S. Decomposition Chemistry in a Burial Environment. **Soil Analysis in Forensic Taphonomy**, n. Geberth 1996, p. 203–223, 2008.

FOUNTAIN, M. T.; HOPKIN, S. P. Folsomia candida (Collembola): A “standard” soil arthropod. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 201–222, 2005.

FRANCO, D. S. et al. The environmental pollution caused by cemeteries and cremations: A review. **Chemosphere**, v. 307, n. P4, p. 136025, 2022.

GARCÍA-MORENO, D. et al. The zebrafish: A research model to understand the evolution of vertebrate immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 90, p. 215–222, 2019.

GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 10, p. 781–792, 2004.

GOES, E. C. et al. Effects of putrescine injection in broiler breeder eggs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 105, n. 2, p. 294–304, 2021.

GOFF, M. L. Current concepts in forensic entomology. **Current Concepts in Forensic Entomology**, p. 1–376, 2010.

GÓMEZ, F. G. et al. Proposal of an Initial Environmental Management and Land Use for Critical Cemeteries in Central Ecuador. **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 3, 2022.

GONÇALVES, L. R. et al. Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic—the environmental impact. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 2, p. 1696–1711, 2022.

GONÇALVES, L. R. **Análise dos efeitos de associações das aminas biogênicas cadaverina e putrescina sobre cultura de fibroblasto de anfíbios e células hepáticas humanas, cultivadas em sistema 2d**. 2022.

GONÇALVES, M. et al. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of composted tannery sludge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 27, p. 34495–34502, 2020.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A. I. et al. Putrescine: A Key Metabolite Involved in Plant Development, Tolerance and Resistance Responses to Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, 2022.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research Regular Papers**, v. 310, n. 2, p. 175–185, 1994.

GUPTA, K. et al. Evaluation of Phytoremediation Potential of Pteris vittata L. on Arsenic Contaminated Soil Using Allium cepa Bioassay. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 108, n. 3, p. 423–429, 2022.

HARA, R. V. **Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da diamina cadaverina, presente no necrochorume, por meio de ensaios com sistemas testes in vitro e in vivo.** Raquel vaz hara programa de pós-graduação em ciências biológicas (biologia celular e molecular), 2016.

HAU, T. C. et al. Decomposition process and post mortem changes: Review. **Sains Malaysiana**, v. 43, n. 12, p. 1873–1882, 2014.

HAUSLER, A. On Burial Customs as an Archaeological Source. **Current Anthropology**, v. 24, n. 5, p. 666–666, 1983.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (Allium cepa) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090–2095, 2009.

HOSHINO, M. H. **Análise do gerenciamento de espaço urbano para sepultamentos**. [s.l: s.n.].

HOWE, K. The zebrafish genome sequencing project: bioinformatics resources. **Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish**, v. 9, p. 551–562, 2020.

IDEHEN, O. A Comparative Investigation of Groundwater Contamination in Typical Dumpsites and Cemetery Using Ert and Physicochemical Analysis of Water in Benin Metropolis, Nigeria. **Journal of Geoscience and Environment Protection**, v. 08, n. 01, p. 72–85, 2020.

ISO - International Organization for Standardization. **Soil Quality-determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora. Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence of Higher Plants**. ISO 11269-2. Geneva, Switzerland, 1995

IOAN, B. G. et al. The chemistry decomposition in human corpses. **Revista de Chimie**, v. 68, n. 6, p. 1450–1454, 2017.

ITODO, A.U; ENEJI, I.S.; KORMI, A. . Estimation of embalming contaminants in soil and groundwater samples from cemetery leachates in mbaiorbo, mbadim-mbatiav leachfield in gboko, **Nigeria**. v. 46, n. 3, p. 482–493, 2021.

JAGUEY-HERNÁNDEZ, Y. et al. Biogenic amines levels in food processing: Efforts for their control in foodstuffs. **Food Research International**, v. 144, n. December 2020, 2021.

JAVAN, G. T. et al. An interdisciplinary review of the thanatomicrobiome in human decomposition. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 15, n. 1, p. 75–83, 2019.

JOIMEL, S. et al. Collembola are Among the Most Pesticide-Sensitive Soil Fauna Groups: A Meta-Analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 41, n. 10, p. 2333–2341, 2022.

JONKER, C.; OLIVIER, J. Mineral contamination from cemetery soils: Case study of Zandfontein Cemetery, South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2012.

JU, H.; ZHU, D.; QIAO, M. Effects of polyethylene microplastics on the gut microbial community,

reproduction and avoidance behaviors of the soil springtail, Folsomia candida. **Environmental Pollution**, v. 247, p. 890–897, 2019.

KASHINA, E.; AHOLA, M.; MANNERMAA, K. Ninety years after: New analyses and interpretations of Kubenino hunter-gatherer burials, north-western Russia (c. 5000 cal BC). **Quaternary International**, v. 574, n. September 2020, p. 78–90, 2021.

KHOO, L. S. et al. Management of the dead during COVID-19 outbreak in Malaysia. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 16, n. 3, p. 463–470, 2020.

KIM, H. J. et al. Optimization of direct lysine decarboxylase biotransformation for cadaverine production with whole-cell biocatalysts at high lysine concentration. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1108–1113, 2015.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.

KLAASSENS, M.; GROOTE, P. D. Postmodern crematoria in the Netherlands: A search for a final sense of place. **Mortality**, v. 19, n. 1, p. 1–21, 2014.

KONESTABO, H. S. et al. Pesticide effects on the abundance of springtails and mites in field mesocosms at an agricultural site. **Ecotoxicology**, v. 31, n. 9, p. 1450–1461, 2022.

KUMAR, S. et al. Ion-Pair Facilitated Non-Enzymatic Electrochemical Sensing of Cadaverine and Putrescine. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 168, n. 4, p. 047505, 2021.

LAVADO, G. J. et al. QSAR models for soil ecotoxicity: Development and validation of models to predict reproductive toxicity of organic chemicals in the collembola Folsomia candida. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, n. PB, p. 127236, 2022.

LEE, Y. L. et al. Toxic Effects and Mechanisms of Silver and Zinc Oxide Nanoparticles on Zebrafish Embryos in Aquatic Ecosystems. **Nanomaterials**, v. 12, n. 4, p. 1–18, 2022.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in Allium cepa cells exposed to petroleum polluted water-A case study. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80–86, 2008.

LEMES, L. et al. Identification of main environmental impacts produced in a municipal cemetery. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 15, n. 2, 2022.

LINS, E. A. M.; LINS, A. DA S. B. Negative environmental impacts generated by cemetery : Case study. **International Journal of Advanced Scientific Research**, n. November 2019, p. 6–9, 2019.

LOVERN, S. B.; KLAPER, R. Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 1132–1137, 2006.

MARTINHO, B.; LOPES, I. Revisão sobre a avaliação da toxicidade de contaminantes ambientais em linhas celulares de anfíbios. **Captar Ciência e Ambiente para todos**, v. 11, 2022.

MCGOWAN, G.; PRANGNELL, J. A method for calculating soil pressure overlying human burials. **Journal of Archaeological Science**, v. 53, p. 12–18, 2015.

MORADI, S. et al. The influence of Cadaverine on the structure, stability, and activity of acid phosphatase. **Journal of Molecular Structure**, v. 1247, p. 131372, 2022.

MYTUM, H. Public health and private sentiment: The development of cemetery architecture and funerary monuments from the eighteenth century onwards. **World Archaeology**, v. 21, n. 2, p.

283–297, 1989.

NASCIMENTO, F. L. Cemitério X Novo Coronavírus: Impactos Da Covid-19 Na Saúde Pública E Coletiva Dos Mortos E Dos Vivos. **Boletim de Conjuntura**, v. 2, p. 75–86, 2020.

NATAL-DA-LUZ, T. et al. Ecotoxicological characterization of a tropical soil after diazinon spraying. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 8, p. 2163–2176, 2012.

NECKEL, A. et al. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. **urbe. Revista Brasileira de Gestão Urbana**, 2017.

NECKEL, A. et al. Hazardous elements in the soil of urban cemeteries; constructive solutions aimed at sustainability. **Chemosphere**, v. 262, 2021.

NETTO, L. G. et al. Delineation of necroleachate pathways using electrical resistivity tomography (ERT): Case study on a cemetery in Brazil. **Environmental Challenges**, v. 5, n. May, p. 100344, 2021.

NGUYEN, T.; NGUYEN, L. Groundwater pollution by longstanding cemetery and solutions for urban cemetery planning in Ho Chi Minh City - From reality to solutions. **MATEC Web of Conferences**, v. 193, 2018.

OCHIR-GORYAEVA, M. A. et al. Ancestry and identity in Bronze Age Catacomb culture burials: A meta-tale of graves, skeletons, and DNA. **Journal of Archaeological Science: Reports**, v. 37, n. January 2020, p. 102894, 2021.

OECD/OCDE - The organisation for economic co-operation and development. Collembolan reproduction test in soil. 2009.

OGBONNA, N. I. The Burial Rites in the three Religions in Nigeria: Their Importance to the Nigerian Nation. **Sapientia Global Journal of Arts, Humanities and Development Studies**, v. 4, n. 1, p. 189–196, 2021.

OLIVEIRA, L. O. DE et al. The Analysis of the Presence of Necrochorume in Communities in the Vicinity of the Cemetery Parque de Manaus and Nossa Senhora Aparecida. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 6, n. 11, p. 454–459, 2019.

OLIVEIRA, J. J. Comportamento de fuga de folsomia candida expostos a solos escape behavior of folsomia candida exposed to soils contaminated. p. 315–321, 2021.

ONYEJIKE, D. N. et al. Estimation of Time Since Death of Bodies Above Soil Surface in A Guinea Forest-Savannah Vegetation of Nigeria Using Visible Post Mortem Changes. **International Journal of Anatomy and Research**, v. 10, n. 3, p. 8398–8407, 2022.

OZCELIK, F.; TEMEL, M. C.; KALE, E. The role of biogenic amines in nutrition. **Internatiol Journal of Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 21–29, 2020.

PALMIERI, M. J. et al. Cytotoxicity of Spent Pot Liner on Allium cepa root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 442–447, 2016.

PARK, J. et al. The sensitivity of an hydroponic lettuce root elongation bioassay to metals, phenol and wastewaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 147–153, 2016.

PARK, Y. K.; LEE, J. H.; MAH, J. H. Occurrence and reduction of biogenic amines in traditional Asian fermented soybean foods: A review. **Food Chemistry**, v. 278, n. August 2018, p. 1–9, 2019.

PARKER, M. O. Adult vertebrate behavioural aquatic toxicology: Reliability and validity. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 323–329, 2016.

PEREIRA, F. D. C. **Estudo dos efeitos biológicos da poliamina putrescina em diferentes organismos-teste**, 2017.

PINHEIRO, J. Decay process of a cadaver. **Forensic Anthropology and Medicine: Complementary Sciences From Recovery to Cause of Death**, p. 85–116, 2006.

PITTNER, S. et al. A field study to evaluate PMI estimation methods for advanced decomposition stages. **International Journal of Legal Medicine**, v. 134, n. 4, p. 1361–1373, 2020.

RAO, D. An analytical study of decomposed bodies during forensic autopsies. **IP International Journal of Forensic Medicine and Toxicological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 141–146, 2022.

RENDU, W. et al. Evidence supporting an intentional Neandertal burial at la Chapelle-aux-Saints. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 1, p. 81–86, 2014.

ROCHA, L. A. G.; RIBAS, L. C.; BELLO, J. Legislação ambiental incidente sobre cemitérios do estado de São Paulo. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, p. 20–33, 2013.

RODRIGUES, L.; PACHECO, A. Groundwater contamination from cemeteries cases of study. **Environmental 2010: Situation and Perspective for the European Union**, n. May 2003, p. 1–6, 2003.

RUMBLE, H. et al. Disposal or dispersal? Environmentalism and final treatment of the British dead. **Mortality**, v. 19, n. 3, p. 243–260, 2014.

SANZ-VICENTE, I. et al. Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 18, p. 4261–4271, 2020.

SCALENGHE, R.; PANTANI, O. L. Connecting existing cemeteries saving good soils (for livings). **Sustainability (Switzerland)**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2020.

SHAFIEE, F. A. et al. Evaluation of Toxicity Effect of Palm Oil Mill Effluent Final Discharge by using Daphnia magna. **Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 53–59, 2021.

SILVA, R. B. P. DA et al. Concentration of Heavy Metals in Soils under Cemetery Occupation in Amazonas, Brazil. **Soil and Sediment Contamination**, v. 29, n. 2, p. 192–208, 2020.

SILVEIRA, G. L. et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using Allium cepa L. and Lactuca sativa L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, 2017.

TAVARES, R. et al. CEMITÉRIOS , NECROCHORUME E O IMPACTO NO MEIO AMBIENTE : AS ALTERNATIVAS AO PROCESSO DE INUMAÇÃO NO BRASIL PARA O. 2020.

TETI, D.; VISALLI, M.; MCNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 781, n. 1–2, p. 107–149, 2002.

TINA, J. K. **Impacto de inseticidas sobre o comportamento de colêmbolos Folsomia candida (Collembola)**, 2021.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93, n. 3, p. 249–256, 1996.

TKACZYK, A. et al. Daphnia magna model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. **Science of the Total Environment**, v. 763, p. 143038, 2021.

TURAJO, K. A. et al. Burial practice and its effect on groundwater pollution in Maiduguri, Nigeria. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 23, p. 23372–23385, 2019.

USEPA. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. **Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test**. EPA 712-C-96-154. 1996.

USLU, A.; BARI, E.; ERDOAN, E. Ecological concerns over cemeteries. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 13, p. 1505–1511, 2009.

VALLIM, J. H. et al. Chitosan nanoparticles containing the insecticide dimethoate: A new approach in the reduction of harmful ecotoxicological effects. **NanoImpact**, v. 27, n. February, 2022.

VAN GESTEL, C. A. M. Soil ecotoxicology: State of the art and future directions. **ZooKeys**, v. 176, n. SPECIAL ISSUE, p. 275–296, 2012.

VAN WYK, Y.; UBOMBA-JASWA, E.; DIPPENAAR, M. A. Potential SARS-CoV-2 contamination of groundwater as a result of mass burial: A mini-review. **Science of the Total Environment**, v. 835, n. April, p. 155473, 2022.

VASS, A. Beyond the grave – understanding human decomposition. **Microbiology Today**, v. 28, n. 28, p. 190–192, 2001.

VIEIRA, C.; MARCON, C.; DROSTE, A. Phytotoxic and cytogenotoxic assessment of glyphosate on Lactuca sativa L. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1–8, 2022.

WALKER, C.; STREISINGER, G. Induction of mutations by γ-rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos. **Genetics**, v. 103, n. 1, p. 125–136, 1983.

WILLIS;, A.; TAYLERS, N. **Field anthropology application to burial contexts in prehistoric Southeast Asia**. , 2009.

WÓJCIK, W.; ŁUKASIEWICZ, M.; PUPPEL, K. Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. October, 2020.

WORLDOMETER. World population, 2023. Disponível em: https://www.worldometers.info/. Acesso em: 20 de janeiro de 2023.

WROBEL, G. D. et al. Social identity and geographic origin of Maya burials at Actun Uayazba Kab, Roaring Creek Valley, Belize. **Journal of Anthropological Archaeology**, v. 45, p. 98–114, 2017.

XU, E. G. et al. Primary and Secondary Plastic Particles Exhibit Limited Acute Toxicity but Chronic Effects on Daphnia magna. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 6859–6868, 2020.

YOON, H. et al. Validation of an HPLC analytical method for determination of biogenic amines in agricultural products and monitoring of biogenic amines in Korean fermented agricultural products. **Toxicological Research**, v. 31, n. 3, p. 299–305, 2015.

ZHANG, H.; PARKER, L. E. Bio-inspired predictive orientation decomposition of skeleton trajectories for real-time human activity prediction. **Proceedings - IEEE International Conference on Robotics and Automation**, v. 2015-June, n. June, p. 3053–3060, 2015.

ZHOU, Y. et al. Impacts of benzovindiflupyr on the embryonic development of zebrafish (Danio rerio). **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 100, n. 8–10, p. 753–768, 2018.

ZORTÉA, T. et al. Comportamento De Fuga De Colêmbolos Expostos a Solos Contaminados Com Cipermetrina. **Scientia Agraria**, v. 16, n. 4, 2016.

ZYCHOWSKI, J.; BRYNDAL, T. Impact of cemeteries on groundwater contamination by bacteria and viruses - A review. **Journal of Water and Health**, v. 13, n. 2, p. 285–301, 2015.

ANEXO 1

Embrapa

Meio Ambiente

M.CEUA.CNPMA No 002/2022

Jaguariúna, 21 de março de 2022.

Vera Lúcia Scherholz S. de Castro
Embrapa Meio Ambiente

AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos ecotoxicogenéticos das aminas biogênicas cadaverina e putrescina, isoladas e associadas entre si, por meio de ensaios com diferentes sistemas-teste in vitro e in vivo", registrada com o nº 001/2022, sob a responsabilidade de Vera Lúcia Scherholz S. de Castro que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em reunião de 18/03/2022.

Finalidade	( )Ensino (X)Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/04/2022 a 01/06/2022
Espécie/linhagem/raça	*Danio rerio*
Nº de animais	120 machos, 60 fêmeas e 432 embriões
Peso/Idade	Adultos (4 a 12 meses)
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança

Vice-Coordenador da CEUA

Secretário da CEUA