

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 16/03/2018.

---

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

---

**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**

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

Rio Claro - SP  
2016

**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**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Marin Morales

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

Rio Claro - SP  
2016

574.88 Hara, Raquel Vaz  
H254a 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. - Rio  
Claro, 2016  
135 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Biologia molecular. 2. Contaminação ambiental. 3.  
Allium cepa. 4. Cultura de células. 5. Ratos Wistar. 6.  
Genotoxicidade. 7. Mutagenicidade. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da diamina cadaverina, presente no necrochorume, por meio de ensaios com sistemas testes *in vitro* e *in vivo*

AUTORA: RAQUEL VAZ HARA

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 / Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP

Prof. Dr. MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO  
Fundação Hermínio Ometto, UNIARARAS

Profa. Dra. BRUNA DE CAMPOS VENTURA CAMARGO  
Faculdade Sudoeste Paulista

Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO  
Departamento de Fonoaudiologia / Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília - UNESP

Profa. Dra. LARISSA FONSECA ANDRADE VIEIRA  
Departamento de Biologia / Universidade Federal de Lavras - Videoconferência

Rio Claro, 16 de setembro de 2016

Dedico esse trabalho a Deus e aos meus  
grandes incentivadores, meus pais  
Antônio e Tereza

*“Aqueles que passam por nós,  
não vão sós, não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si, levam  
um pouco de nós.”*

*(O pequeno príncipe - Antoine Saint-Exupéry)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter abençoado a minha vida acadêmica, me dando forças para vencer os obstáculos e por ter colocado em meu caminho pessoas iluminadas que fizeram parte dessa trajetória. Por ser a minha coragem e fé nos momentos de medo - “Tudo posso Naquele que me fortalece...”

Aos meus queridos pais, Tereza e Antônio, pelo apoio, confiança, amor, carinho, companheirismo e, principalmente, por entenderem a minha ausência. Vocês são os grandes responsáveis por essa conquista e me fazem ser a pessoa mais feliz do mundo pelo simples fato de estarem sempre ao meu lado. Amor infinito e incondicional.

Ao meu irmão Ricardo e minha cunhada Maria Angelica, obrigada pela amizade, conversas e brincadeiras.

Aos meus avós, Chyoko Hara, Keizo Hara, Rosa Vaz e Pedro Vaz, pelo exemplo de vida.

A toda a minha família, tios e tias, primos e primas, que não citarei os nomes porque Deus, com toda a sua bondade, me presenteou com uma família grande e que mesmo com alguns distantes estão guardados no meu coração com belas lembranças.

Ao meu namorado Igor Jardim, que chegou no final do segundo tempo, mas foi fundamental para a conclusão desse trabalho. Obrigada pela companhia enquanto eu finalizava esse trabalho, pela paciência, pelo colo, pelos mimos, por me trazer paz, amor e carinho. Te amo demais! E aos seus pais, D. Rosa e Jossue, por me acolherem e cuidarem tão bem de mim, obrigada por tudo!

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Marin Morales, por permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa. Sou eternamente grata pela oportunidade. Obrigada pela paciência, dedicação, amizade, apoio, pela orientação e, principalmente, por ser um exemplo de profissional e pessoa.

A todos os meus amigos e colegas mutagênicos: Bairral, Camila, Cris (mini-mini), Cleiton, Franco, Jaque pira (Pedro), Jorge, Laís, Leticia Gigeck, Leticia Gonçalves, Leticia, Bulas, Márcia (Julinha), Maria Tereza, Matheus, Michele, Nádia, Thays, William, Samatha, Priscila, Mileni, pelo convívio mais que especial, pelas risadas e conversas, por fazer meus dias mais alegres. Especialmente, aos meus amigos do “grupo Lab”, pelo convívio fora do laboratório, pelos conselhos, pelos desabafos, vocês se tornaram grandes amigos que eu levarei no meu coração para sempre.

Às amigas de toda vida, Carol, Gabi, Luana e Thaís, sempre presentes em minha vida. Simplesmente uma amizade eterna!

Às amigas “PaSSSas”, Andrea e Talita, por essa amizade que cresce a cada dia, pela parceria, conversas, tapiocas, zumbas, shopping de 12 horas, que venham muito mais aventuras para nós.

À amiga, Maria Tereza, pelo convívio em casa, pela amizade de todas as horas, pela diversão garantida. Obrigada por ser a minha família Rioclarense e me ajudar em todos os momentos.

À amiga Michele, por todas as inúmeras ajudas no inglês e nas traduções. Muito obrigada pela sua amizade.

Ao amigo Franco, pela parceria nesse doutorado, pelas inúmeras idas à Araras, pelas trocas de conhecimento, por ser o braço direito dessa pesquisa, pela amizade, e que tenhamos muito sucesso nas próximas etapas.

Às minhas orientadas, Cris, Gabi, Lais e Katharine, que acompanharam todo o período experimental com os ratos, extremamente responsáveis pelo sucesso desses experimentos, no qual eu muito mais aprendi do que ensinei.

À Profa. Grasiela Severi-Aguiar, por auxiliar nos experimentos com ratos e por abrir as portas da UNIARARAS para a realização dos experimentos.

À UNIARARAS, por permitir o desenvolvimento dos experimentos com ratos e por fornecer todos os materiais utilizados.

À minha co-orientada, Leticia Gigeck, pela oportunidade de orientá-la, com quem eu também aprendo muito.

À amiga Tânia e sua família, uma amizade essencial que quero levar por toda a minha vida. Obrigada por me acolherem nos momentos difíceis, pela amizade, carinho, conversas, preocupações, risadas, bafões, pelos foras, e muitas outras coisas que tornaram essa amizade sólida e sincera.

Ao colega Thiago Gazoni, por trazer as células Speedy para o Brasil e que me auxiliou na implantação dessa linhagem no Laboratório de Mutagênese.

À capes, pelo apoio financeiro.

A todos os professores do departamento de biologia, área biologia celular e molecular, pela transmissão de conhecimento durante o mestrado.

Aos técnicos do departamento de Biologia (Gerson, Roberta e Mônica) e aos técnicos da UNIARARAS (Renata, Pablo, Carol e Dani), obrigada pela ajuda nesse trabalho.

A todos os colegas do departamento de biologia pelo convívio agradável de todos os dias.

**E**nfim... A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho! MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

A decomposição dos corpos é considerada uma fonte de poluição, devido à produção de um líquido orgânico denominado de necrochorume, que, além de comprometer o meio ambiente, pode causar sérios problemas à saúde humana. Na composição desse líquido, encontra-se a amina biogênica cadaverina ( $C_5H_{14}N_2$ ), uma substância altamente tóxica, produzida durante a putrefação de tecidos orgânicos de corpos em decomposição. Considerando que os cemitérios são locais de disposição de cadáveres e que a decomposição dos corpos gera substâncias tóxicas, como a cadaverina, torna-se muito importante a avaliação dos comprometimentos ambientais que possam ser desencadeados por este contaminante. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e oxidativos de diferentes concentrações da diamina cadaverina, por meio de ensaios ecotoxicológicos realizados com sistemas-teste *in vitro* e *in vivo*. Foram utilizados três sistemas-teste distintos: *Allium cepa*, células de anfíbio (Speedy) e células de hepatoma humano (HepG2) mantidas em cultura e ratos Wistar. Em *A. cepa*, foram aplicados os testes de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) em células meristemáticas, os quais são indicativos de efeitos genotóxico e mutagênico, respectivamente. Foram testadas as concentrações 61,5, 184,5, 307,5, 430,5 e 553,5 mg/L. A elevada frequência de aderências cromossômicas e células binucleadas inferem uma ação aneugênica para a cadaverina. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa o Índice Mitótico (IM) e no Índice de Mutagenicidade (IMut). Em relação ao teste da resazurina realizado em cultura de células, utilizando células Speedy e HepG2, foi possível observar um efeito citotóxico para ambas as linhagens, sendo as células Speedy mais sensíveis que as células HepG2. O ensaio do cometa realizado com as mesmas linhagens celulares não apresentaram danos significativos no DNA. No entanto, no teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese houve um aumento significativo na frequência de brotos (HepG2 – 184,5 e 307,5 mg/L; Speedy – 30,75, 61,5 e 123,0 mg/L), pontes (Speedy – 30,75, 61,5 e 123,0 mg/L) e MN (HepG2 – 184,5 e 307,5 mg/L; Speedy – 123,0 mg/L), indicando uma ação genotóxica e mutagênica para essa diamina. Os ensaios com ratos machos Wistar, foram realizados com a administração por via oral da cadaverina, nas doses de 15, 30 e 60 mg/Kg/dia, por um período de exposição de 56 dias consecutivos. Para investigar o potencial genotóxico em ratos, foi realizado o ensaio do cometa com sangue periférico, a partir das medições da

intensidade, comprimento e momento da cauda, foi possível observar que a cadaverina não causou diferença significativa de quebras no DNA, comparando-se com o controle negativo. Pelo teste do MN com células de medula óssea foi possível observar que a cadaverina não induziu citotoxicidade, pois não houve diferença significativa na taxa de Eritrócitos policromáticos (PCE)/Eritrócitos normocromáticos (NCE). Já para a frequências de MN em PCE, houve um aumento significativo nos animais tratados com a concentração de 30 mg/Kg de cadaverina, representando uma instabilidade genômica. A partir desses resultados podemos inferir, novamente, uma ação aneugênica da cadaverina. Por fim, foi avaliada a capacidade da cadaverina induzir alterações no equilíbrio redox das células hepáticas de ratos Wistar. Foram quantificados os grupos sulfidrilas (-SH), os níveis de glutathiona (GSH), a atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona S-transferase (GST) e a peroxidação lipídica (método TBARS). Foi possível observar um aumento significativo dos valores quantificados nos ensaios para avaliação dos grupos -SH, para o grupo tratado com 15 mg/Kg de cadaverina. Embora alguns resultados não tenham apresentado diferenças estatisticamente significativas, observamos uma ligeira diminuição nos níveis de GSH e um aumento da peroxidação lipídica, para todas as concentrações testadas. Esses dados indicam que a diminuição da GSH pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), que resultam na peroxidação lipídica no fígado. Quanto às atividades das enzimas CAT, SOD e GST, não houve resultados significativos para nenhuma das concentrações testadas. Portanto, os resultados sugerem que a cadaverina pode apresentar efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e oxidativos, dependendo do organismo testado. Assim, pelos métodos aplicados nesta pesquisa foi possível também inferir alguns mecanismos de ação e, assim, contribuir para o conhecimento da toxicidade da cadaverina, uma vez que há poucos estudos realizados na área ecotoxicológica.

**Palavra-chave:** *Allium cepa*, Cultura de células, ratos Wistar, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, estresse oxidativo

## ABSTRACT

The decomposition of bodies is considered a pollution resource due to the production of an organic liquid denominated as necrochorume that, besides compromising the environment, it can cause serious problems to human health. In the composition of this liquid, the amine cadaverine can be found ( $C_5H_{14}N_2$ ), a highly toxic substance, produced during putrefaction of organic tissues of the bodies in decomposition. Whereas the cemeteries are disposal locals for dead bodies and that the decomposition of the bodies generates toxic substances, like cadaverine, the evaluation of the compromising of the environment, which can be unleashed by this contaminant, becomes very important. Therefore, the present study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic, mutagenic and oxidative effects of different concentrations of the diamine cadaverine, by ecotoxicological assays performed with the test systems *in vitro* and *in vivo*. Three different test organisms were used: *Allium cepa*, HepG2 and Speedy cells maintained in culture and Wistar rats. With the *A. cepa* organism, tests for chromosomal aberrations and micronucleus in meristematic cells were applied, which are indicatives of genotoxic and mutagenic effects respectively. The concentrations of 61,5, 184,5 e 307,5, 430,5 e 553,5 mg/L were tested. The elevated frequency of chromosomal adherence and binucleated cells infer an aneugenic action to the cadaverine. Besides, there was no statistically significant difference in the Mitotic Index (MI) values and to the Mutagenicity Index (MutI). Regarding the resazurin assay, performed with cell culture, by using human hepatoma cells (HepG2) and amphibian cells (Speedy), it was possible to observe that the cadaverine was cytotoxic for both cell lines, though, the Speedy cells were more sensible than the HepG2 cells. The comet assay performed with the same cell lines did not show significant damages on the DNA. However, in the cytokinesis-block micronucleus technique there was a significant increase in the frequency of nuclear buds (HepG2 – 184,5 e 307,5 mg/L; Speedy – 30,75, 61,5 e 123,0 mg/L), nuclear bridges (Speedy – 30,75, 61,5 e 123,0 mg/L) and MN (HepG2 – 184,5 e 307,5 mg/L; Speedy – 123,0 mg/L), which indicates a genotoxic and mutagenic action to this diamine. The assays with male Wistar rats were performed by oral administration of the cadaverine, in doses of 15, 30 e 60 mg/kg/day, for an exposition period of 56 consecutive days. To investigate the genotoxic potential in rats, the comet assay was performed with peripheral blood and, from the measurements of the intensity, length and moment of the tail, it was possible to observe that the cadaverine did not cause a

significant difference in the DNA breaks when compared to the negative control. By the MN test with bone marrow cells was possible to observe that the cadaverine did not induce cytotoxicity because there was not a significant difference in the Polychromatic Erythrocytes (PCE)/Normochromatic Erythrocytes (NCE) rate. To the MN frequency in PCE, there was a significant increase in the animals treated with the concentration of 30 mg/Kg of cadaverine, considered as an indicative of genomic instability. From these results, we can infer, again, an aneugenic action of the cadaverine. Lastly, the ability of the cadaverine to induce changes in the redox balance of the hepatic cells of Wistar rats was evaluated. The sulfhydryl groups (-SH), GSH levels, the activity of the CAT, SOD, GST enzymes and the lipidic peroxidation (TBARS) were quantified. It was possible to observe a significant increase of the values quantified in the assays to evaluate sulfhydryl groups (-SH), in the group treated with 15 mg/Kg of cadaverine. Although some results have not shown statistically significant difference, it was observed a slight decrease in the GSH levels and an increase in the MDA levels for all tested concentrations. These data indicate that the decrease in the GSH can generate oxygen-reactive species (ERO), which result in the lipidic peroxidation in the liver. Regarding the activity of the enzymes CAT, SOD and GST, there were not significant results for none of the tested concentrations. Thus, the results suggest that the cadaverine can present cytotoxic, genotoxic, mutagenic and oxidative effects, depending on the tested organism. Thereby, by the applied methods in this research, it was also possible to infer some action mechanisms and, thus, contribute to the knowledge of the cadaverine's toxicity, once that a few studies have been performed in the ecotoxicological area.

**Keywords:** *Allium cepa*, cells culture, Wistar rats, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, oxidative stress

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| 3R              | Replacement, Reduction e Refinement ou Redução, refinamento e substituição  |
| Abs             | Absorbância   |
| AC              | Aberrações Cromossômicas  |
| CAT             | Catalase  |
| CDNB            | 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno  |
| CL              | Concentração Letal  |
| CN              | Controle Negativo   |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono  |
| COBEA           | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal   |
| CONAMA          | Conselho Nacional do Meio Ambiente  |
| CP              | Controle Positivo   |
| DNTB            | 5-5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) ou ácido ditionitrobenzoico   |
| DNA             | Ácido desoxirribonucleico   |
| ERO             | Espécies Reativas de Oxigênio   |
| GSH             | Glutathiona Reduzida  |
| GST             | Glutathiona S-transferase   |
| HepG2           | Células de Hematoma Humano  |
| IDC             | Índice de Divisão Celular   |
| IM              | Índice Mitótico   |
| LMP             | Low Melting Point ou Agarose de baixo ponto de fusão  |
| MDA             | Malondialdeído  |
| MEM             | <i>Meio Mínimo Essencial Eagle</i> ou Meio essencial mínimo Eagle   |
| MMS             | metilmetano sulfonato   |
| MN              | Micronúcleo   |
| NCE             | Eritrócito Normocromático   |
| NMP             | Normal Melting Point ou Agarose normal  |
| OECD            | Organization for Economic Co-operation and Development ou Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico |
| OMS             | Organização Mundial da Saúde  |
| PBS             | Solução salina tamponada com fosfato  |
| PCE             | Eritrócitos Policromáticos  |
| SBF             | Soro Bovino Fetal   |
| -SH             | Grupo Sulfidríla  |
| SOD             | Superóxido Dismutase  |
| Speedy          | Fibroblasto de anfíbio  |
| TBA             | thiobarbituric acid ou ácido tiobarbitúrico   |
| TBARS           | Thiobarbituric acid reactive substances ou Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico                             |
| TCA             | Ácido Tricloroacético   |
| UNEP            | United Nations Environmental Program ou Programa das Nações Unidas para o meio ambiente                             |

|       |  |
|-------|--|
| USEPA | US Environmental Protection Agency ou Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos |
| WHO   | World Health Organization ou Organização mundial de saúde                              |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>  | <b>18</b> |
| 2.1. Cemitério x Contaminação ambiental.....   | 18        |
| 2.2. Necrochorume.....   | 20        |
| 2.3. Aminas Biogênicas .....   | 20        |
| 2.3.1. Cadaverina .....  | 21        |
| 2.4. Bioindicadores <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....   | 23        |
| 2.4.1. <i>Allium cepa</i> .....  | 23        |
| 2.4.2. Cultura de células .....  | 24        |
| 2.4.3. Ratos Wistar .....  | 25        |
| 2.5. Biomarcadores .....   | 27        |
| 2.5.1. Teste de aberrações cromossômicas (AC).....   | 27        |
| 2.5.2. Teste de citotoxicidade – Resazurina .....  | 28        |
| 2.5.3. Ensaio do cometa.....   | 29        |
| 2.5.4. Teste do MN.....  | 31        |
| 2.5.5. Estresse oxidativo.....   | 32        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>  | <b>35</b> |
| 3.1. Objetivo geral .....  | 35        |
| 3.2. Objetivos específicos .....   | 35        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>36</b> |
| 4.1 Substância Testada.....  | 36        |
| 4.2 Bioensaio com <i>A. cepa</i> .....   | 36        |
| 4.2.1 Taxa de germinação.....  | 36        |
| 4.2.2 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de <i>A. cepa</i> ..... | 37        |
| 4.3 Bioensaios com Cultura de Células (HepG2 e Speedy) .....   | 38        |
| 4.3.1 Ensaio de viabilidade celular - Teste da Resazurina .....  | 38        |
| 4.3.2 Tratamento para o ensaio do cometa e o Teste do MN com bloqueio de citocinese .....                | 40        |
| 4.3.3 Ensaio do Cometa.....  | 41        |
| 4.3.4 Teste do Micronúcleo .....   | 42        |
| 4.4 Bioensaios com ratos Wistar.....   | 43        |
| 4.4.1 Eutanásia e coleta de materiais biológicos .....   | 44        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 4.4.2    | Ensaio do cometa.....  | 44         |
| 4.4.3    | Teste do Micronúcleo em Medula Óssea .....   | 45         |
| 4.4.4    | Quantificação do estresse oxidativo no Fígado .....  | 46         |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>50</b>  |
|          | <b>Artigo 1:</b> Efeitos genotóxicos da diamina cadaverina, avaliados por meio do sistema teste <i>Allium cepa</i> .....                   | <b>51</b>  |
|          | <b>Artigo 2:</b> Potencial genotóxico e mutagênico da cadaverina sobre células de fígado humano (HepG2) e células de anfíbio (Speedy)..... | <b>66</b>  |
|          | <b>Artigo 3:</b> Avaliação da atividade genotóxica e mutagênica da cadaverina para ratos, após exposição oral.....                         | <b>89</b>  |
|          | <b>Artigo 4:</b> Evidências de estresse oxidativo em fígado de ratos Wistar submetidos a diferentes concentrações de cadaverina.....       | <b>105</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>   | <b>118</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>120</b> |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Devido ao crescimento urbano e industrial, tem havido um aumento da contaminação ambiental, gerando vários problemas aos ecossistemas e à saúde humana. Essa problemática tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas que visam buscar novas ferramentas que identifiquem o tipo de contaminação, as possíveis prevenções e soluções para o problema (CATETE, 2010). Deste modo, na tentativa de implantar construções ambientalmente corretas e, assim, evitar alterações nos ambientes, os cemitérios estão sendo foco de atenção, devido ao comprometimento que conferem ao ambiente onde se encontram (SILVA et al., 2012).

Atividades industriais, agrícolas e urbanas causam sérios problemas ambientais, devido ao lançamento dos seus resíduos nas águas superficiais. Esses resíduos, muitas vezes, contêm substâncias tóxicas que impactam os recursos hídricos, dificultando a disponibilidade de água de boa qualidade para a população. Devido a esse fato, a água subterrânea representa uma alternativa para o abastecimento público, pois é considerado muito abundante e ainda de boa qualidade. Porém, a contaminação dessa água é praticamente irreversível, devido aos altos investimentos necessários para sua recuperação, à complexidade do tratamento e a demora de se obterem resultados satisfatórios (MATOS, 2001).

O necrochorume é o resíduo líquido gerado pela decomposição cadavérica, comum em cemitérios, pode se infiltrar no solo contaminando essa malha ambiental, ou ainda, ser carregado pela água da chuva até os aquíferos subterrâneos, levando para esses ambientes produtos químicos orgânicos e inorgânicos potencialmente tóxicos (BOUWER, 1978). Essa problemática envolve a necessidade de se estabelecerem critérios rígidos para a manutenção de cemitérios já existentes e para o licenciamento de novas instalações. Sendo assim, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), visando preservar o meio ambiente em torno de cemitérios, elaborou a resolução nº 335/2003, que dispõe critérios específicos para implantação de novos cemitérios e determina um prazo para que os já existentes se adequem às exigências da legislação. Porém, a preocupação com esse tipo de contaminação ainda persiste, uma vez que, mesmo respeitando as medidas de proteção ambiental, os problemas de saúde pública continuam sendo preocupantes (LELI et al., 2012).

Esse líquido produzido pela decomposição dos corpos e principal causador de contaminação ambiental proveniente dos cemitérios, é composto por microorganismos, metais e substâncias orgânicas, como as aminas cadaverina e a putrescina (CAŁKOSIŃSKI et al., 2015). A cadaverina ( $C_5H_{14}N_2$ ) é uma amina biogênica, produzida pela descarboxilação do

aminoácido lisina presente na matéria orgânica. Essa diamina alifática está presente em diversos processos biológicos, como durante o crescimento e o desenvolvimento dos organismos vivos (BAGNI; TASSONI, 2001). Porém, níveis anormais desta substância estão relacionados com o aparecimento de doenças, incluindo o câncer (GERNER; MEYSKENS, 2004). Segundo Stratton et al. (1991), aminas biogênicas putrefativas, como a cadaverina, constituem um grupo que confere biotoxicidade.

Segundo Ribeiro (2003), a avaliação do potencial mutagênico de um composto químico ou físico faz parte dos testes regulatórios da genética toxicológica. Assim, para esse tipo de análise é muito importante a realização de ensaios *in vivo* e *in vitro*, pois eles são ferramentas eficientes na detecção de mutações e alterações cromossômicas, que podem ser aplicadas a diversos organismos como plantas, insetos e mamíferos, dentre estes o homem (BRUSICK, 1987).

A avaliação dos efeitos tóxicos de substâncias químicas, nas mais diferentes concentrações e tempos de exposição, tem sido aplicada em uma variedade de ensaios, incluindo os citogenéticos (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). A utilização desses testes permite monitorar a extensão de uma poluição e avaliar a toxicidade de uma substância específica (MATSUMOTO, 2004; MATSUMOTO et al., 2006).

Dentre os modelos vegetais superiores, a espécie *A. cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste para o desenvolvimento de estudos na área de ecotoxicologia, pois permite avaliar mecanismos de ação e determinar efeitos de substâncias químicas (BIANCHI et al., 2011; MAZZEO et al., 2011; NUNES et al., 2011; HERRERO et al., 2012; BIANCHI et al., 2016; VENTURA-CAMARGO et al., 2016). O teste de *A. cepa* é considerado de fácil execução e as características citogenéticas da espécie são favoráveis para a avaliação das aberrações cromossômicas (KURAS et al., 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

A cultura de células de diversas linhagens de diferentes organismos teste também são utilizadas em muitas pesquisas que envolvem a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de contaminantes ambientais (MAZZEO et al. 2013; MANZANO et al., 2015; BIANCHI et al., 2015; BONOMO et al., 2016). A aplicabilidade de ensaios com esses sistemas-teste apresenta vantagens, por se tratar de uma técnica reprodutível, rápida, sensível e financeiramente acessível (ROGERO et al., 2003).

O uso de animais em pesquisa científica tem contribuído para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Mesmo com o desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas em sistemas *in vitro*, os modelos *in vivo* apresentam vantagens na obtenção de informações dos

efeitos globais que um determinado agente pode desencadear em um organismo (RIBEIRO et al., 1995; SALÉN, 1995; SNITKOFF, 2004). Animais de várias espécies são utilizados como bioindicadores, mas os camundongos e ratos se destacam por serem sistemas biológicos mais conhecidos e muito utilizados cientificamente (CHORILLI et al., 2007).

A associação do ensaio do cometa com o teste do MN, realizados sob as mesmas condições experimentais, é uma estratégia muito interessante para estabelecer uma correlação entre o composto químico e o seu possível efeito no DNA (VAN GORTHEM et al., 1997). Vários estudos têm aplicado esses dois ensaios em diferentes linhagens celulares animais, incluindo células humanas, obtendo resultados satisfatório quanto ao potencial genotóxico e/ou mutagênico de substâncias químicas (VAN GOETHEM et al., 1997; HARTMANN et al. 2001; MAZZEO et al. 2013; BIANCHI et al., 2015; GAJSKI et al. 2016). Em pesquisas toxicológicas, esses ensaios também são aplicados em células de sangue periférico e células de medula óssea de roedores (RIBEIRO et al., 2009).

Segundo Sohal et al. (2002) e Valavanidis et al. (2006), estudos ecotoxicológicos que avaliam o estresse oxidativo são extremamente importantes, uma vez que contaminantes ambientais podem induzir um desequilíbrio redox entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema de defesa antioxidante. A interferência nesse equilíbrio redox pode causar danos nas estruturas e constituintes celulares, principalmente nos ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (POLI et al., 2004), bem como nas mitocôndrias. Segundo Tsangaris et al. (2011), biomarcadores de estresse oxidativos são sensíveis a contaminantes ambientais e são ferramentas úteis para avaliar a ação de misturas complexas e substâncias químicas.

O presente trabalho avaliou a toxicidade da cadaverina, uma amina biogênica presente no necrochorume que é derivada da putrefação de corpos. O estudo ecotoxicológico das substâncias presentes no necrochorume é extremamente relevante, principalmente, por estar envolvido com a contaminação ambiental que pode comprometer diferentes ecossistemas. Portanto, estudos que avaliem esse tipo de contaminação são de grande importância, pois servem para informar e conscientizar a sociedade e os órgãos de gestão ambiental sobre os efeitos dos constituintes deste tipo de contaminante ainda tão pouco estudado. A falta de conhecimento sobre os potenciais efeitos desses poluentes ambientais, somado ao desconhecimento da sociedade sobre esse assunto, faz com que as medidas necessárias para prevenir e recuperar os ambientes impactados sejam pouco discutidas.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, realizados com diferentes concentrações de cadaverina aplicadas a diferentes sistemas testes, pode-se concluir que:

- A utilização de diferentes bioindicadores e biomarcadores contribuíram para uma análise mais completa e significativa dos riscos que a cadaverina pode promover ao ambiente e aos organismos expostos.

- As concentrações de 61,5, 184,5 e 307,5 mg/L da cadaverina foram genotóxicas para as células meristemáticas de *A. cepa*, devido ao aumento de aberrações cromossômicas, como aderências cromossômicas e células binucleadas, que indicam uma ação aneugênica dessa substância. Todas as concentrações testadas de cadaverina não apresentaram efeito citotóxico e mutagênico para esse mesmo organismo-teste.

- Os ensaios realizados com células HepG2 e Speedy mantidas em cultura, mostraram um efeito citotóxico da cadaverina para ambas as linhagens. Também se observou que as células Speedy foram mais sensíveis que as células HepG2 para a ação da cadaverina.

- A avaliação da genotoxicidade da cadaverina, por meio do ensaio do cometa, não demonstrou efeito da substância sobre o DNA, confirmando que a genotoxicidade observada para *A. cepa* foi devido a ação aneugênica dessa substância. Porém, no teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, a cadaverina apresentou efeito mutagênico, confirmado pela elevada frequência de MN, e efeito genotóxico, pelo aumento dos índices de brotos nucleares e pontes núcleoplasmáticas, para ambas as linhagens. Esses dados também corroboraram a ação aneugênica da substância, pois os efeitos observados para os três sistemas testes, indicam uma ação da cadaverina mais relacionada ao aparelho mitótico da célula do que propriamente com o DNA, confirmando a ação aneugênica proposta.

- As concentrações de cadaverina estudadas não foram genotóxicas para ratos Wistar, pelos ensaios realizados com sangue periférico pelo ensaio do cometa. Pelo teste do MN com células de medula óssea, observou-se que a cadaverina não induziu citotoxicidade, uma vez que não houve mudança significativa na relação entre eritrócitos policromáticos (PCE)/eritrócitos normocromáticos (NCE). No entanto, a frequência de MN em PCE, apresentou um aumento significativo nos animais tratados com concentração de 30 mg/Kg de cadaverina, considerado um indicativo de instabilidade genômica. Esses dados confirmam a ação da cadaverina, observada para os outros sistemas-teste, e reforça a sua aneugenicidade.

- O ensaio do cometa e o teste do micronúcleo, realizados em sistemas *in vitro* e *in vivo*, demonstraram ser eficientes e complementares na avaliação genotóxica e mutagênica de substâncias químicas;

- Quanto ao potencial oxidativo da cadaverina, avaliado em células hepáticas de ratos Wistar, pode-se inferir que a cadaverina pode influenciar nos índices dos grupos -SH, GSH e provocar a peroxidação lipídica. As atividades enzimáticas da CAT, SOD e GST não foram comprometidas, após os indivíduos serem expostos à cadaverina;

- Pela variedade de efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e oxidativos ocasionados pela cadaverina, acredita-se que a sua presença no ambiente deve ser considerada uma preocupação de risco ambiental;

Esse trabalho buscou reunir o maior número de dados possíveis para contribuir com o conhecimento toxicológico da cadaverina, que tem sido pouco estudada como um contaminante ambiental e, assim, incentivar a realização de outras pesquisas com essa substância e em ambientes impactados por cemitérios.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth. Enzymol.**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A New Rapid and Simple Nonradioactive Assay to Monitor and Determine the Proliferation of Lymphocytes—An Alternative to [H-3] Thymidine Incorporation Assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211–224, 1994.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M. Jr.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.
- ALLAMEH, A.; VANSOUN, E. Y.; ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Mech. Ageing Dev.**, v. 95, p. 71–79, 1997.
- ALMEIDA, A. M.; MACÊDO, J. A. B. Parâmetros físico-químicos de caracterização da contaminação do lençol freático por necrochorume. Seminário de Gestão Ambiental, 2005.
- AL-SABTI K.; METCALFE C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, n. 2-3, p. 121-135, 1995.
- AMORIM, Q. S. D.; CRUZ, C. F. Avaliação da contaminação de lençóis freáticos por necrochorume – Cachoeira- Bahia/Brasil. **Científico**, v. 14, n. 27, 2014.
- ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J., Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v.560, p.57–67, 2004.
- ARORA, K.; NAMRATA, S.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. Evaluation of Genotoxic Risks Due to Temporal Changes in Soil Urea: Using *Allium cepa* L. Root Tip Bioassay. **Cytologia**, v. 79, n. 1, p. 85–93, 2014.
- BACH, B.; LE QUERE, S.; VUCHOT, P.; GRINBAUMC, M.; BARNAVON, L. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 114–119, 2012.
- BACHRACH, U. Polyamines and cancer: minireview article. **Amino Acids**, v. 26, p. 307–309, 2004.
- BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. **Amino Acids.**, v. 20, n. 3, p. 301-17, 2001.
- BAKARE, A. A.; ADEYEMI, A. O.; ADEYEMI, A.; ALABI, O. A.; OSIBANJO, O. Cytogenotoxic effects of electronic waste leachate in *Allium cepa*. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v. 65, n. 2, 94–100, 2012.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. Br.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; M., RODRIGUES, V. P.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v.23, n. 4, p. 629-643, 2010
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARDÓCZ, S. The role of dietary polyamines. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 47, p. 683–690, 1993.
- BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 826–833, 2011.

- BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 120, p. 174-83, 2015.
- BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-83, 2016.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, v. 12, n. 12, p. 123-30, 1999.
- BONOMO, M. M.; MOROZESK, M.; DUARTE, I. D.; ROCHA, L. D.; FERNANDES, M. N.; MATSUMOTO, S. T. Sewage sludge hazardous assessment: chemical evaluation and cytological effects in CHO-k1 cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, n. 23, v. 11, p. 11069-75, 2016.
- BOUWER, H. Groundwater Hydrology, **McGraw-Hill Inc.**, New York, 1978.
- BRUSICK, D. **Principles of Genetic Toxicology**. 2 ed., Estados Unidos: Plenum Publishing Corporation, p. 1-432, 1987.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 52, p. 302–310, 1987.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, p. 287–299, 2011.
- CAŁKOSIŃSKI, I.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; OSTAPSKA, M.; DUDEK, K.; GAMIAN, A.; RYPUŁA, K. Microbiological Analysis of Necrosols Collected from Urban Cemeteries in Poland. **Biomed Res Int.**, v. 2015, p. 169573, 2015.
- CAMPESTRE, M. P.; BORDENAVE, C. D.; ORIGONE, A. C.; MENÉNDEZ, A. B.; RUIZ O. A.; RODRÍGUEZ, A. A.; MAIALE, S. J. Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. **J. Plant Physiol.**, v. 168, p. 1234–1240, 2011.
- CARDOZO, T.R.; ROSA, D.P.; FEIDEN, I.R.; ROCHA, J.A.V.; D'AVILA DE OLIVEIRA, N.C.; PEREIRA, T.S.; PASTORIZA, T.F.; MARQUES, D.M.; LEMOSA, C.T.; TERRA, N.R.; VARGAS, V.M.F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v. 603, p. 83–96, 2006.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722-5, 2008.
- CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BUCCIARELLI, T.; BOCCIO, P. D.; FEDERICI, L.; ILIO, C. D. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 48-57, 2008.
- CARVALHO, T. U. Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). Métodos de Estudo da Célula. Rio de Janeiro: **FENORTE/UENF.**, v. 2, p. 45-58, 1996.
- CASTRO, D. L. Caracterização geofísica e hidrogeológica do cemitério bom jardim, fortaleza – CE. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 26, p. 251-271, 2008.
- CATETE, C. P. Investigações ambiental e forense com os métodos geofísicos radar de penetração do solo, polarização induzida e eletrorresistividade no Cemitério do Tapanã, Belém/Pará. Dissertação, 2010.

- CAVALCANTE, D. G.; DA SILVA, N. D.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A.; MARTINEZ, C. B. Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of biodiesel produced by different routes on ZFL cell line. **Toxicol In Vitro**, v. 28, n. 6, p. 1117-25, 2014.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264–271, 2005.
- ÇELİK, A.; EKINCI, S. Y.; GÜLER, G.; YILDIRIM, S. In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test and comet assay. **DNA Cell Biol.**, v. 33, n. 3, p. 148-54, 2014.
- CESARATTO, L.; VASCOTTO, C.; CALLIGARIS, S.; TELL, G. The importance of redox state in liver damage. **Annals of Hepatology**, v. 3, n. 3, p. 86-92, 2004.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>, 2013.
- CHAUHAN, L. K. S.; SUNDARARAMAN, V. Effects of substituted ureas on plant cells. I. Cytological effects of isopruturon on the root meristem cells of *A. cepa*. **Cytologia**, v. 55, p. 91–98, 1990.
- CHAUHAN, L.; SAXENA, P.; GUPTA, S. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environ. Exp. Bot.**, v. 42, p. 181–189, 1999.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.
- CHU, C. H.; BJELDANES, L. F. Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. **J Food Sci**, v. 47, p. 79–80, 1981.
- COLLINS, K. E.; CRONIN, A. A.; RUEEDI, J.; PEDLEY, S.; JOYCE, E.; HUMBLE, P. J.; TELLAM, J. H. Fate and transport of bacteriophage in UK aquifers as surrogates for pathogenic viruses. **Eng. Geol.**, v. 85, p. 33–38, 2005.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 335, de 03 de abril de 2003. Dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=359>.
- DE FRIES, R.; MISTUHASHI, M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of Alamar Blue assay to 3H-thymidine incorporation assay. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 9, p. 89 95, 1995.
- DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol.**, v. 25, p. 5–32, 2009.
- DURIE, B. G. M.; SALMON, S. E.; RUSSELL, D. H. Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 37, p. 214–222, 1977.
- EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environ Mol Mutagen.**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem.* **Biophys.**, V. 82, p. 70–77, 1959.
- EVANS, P. T.; MALMBERG, R. L. Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, v. 40, p. 235–269, 1989.

- FAGUNDES, P. R. Legislação Previdenciária. [Teresina]: Curso Professor Paulo Roberto Fagundes, 2004.
- FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The Comet assay: A comprehensive review. **Mutation Res.**, v. 339, p. 37–59, 1995.
- FEITOSA, F. A. C.; FILHO, J. M. Hidrogeologia conceitos e aplicações. **CPRM, LABHID, UFPE**. Fortaleza, 412p, 1997.
- FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.
- FENECH, M.; MORLEY, A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**, v. 43, p. 233–246, 1985.
- FENECH, M.; The advantage and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v.392, p.11-18, 1997.
- FENECH, M.; The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.
- FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutat Res.**, n. 504, n. 1-2, p. 131-6.
- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 88, 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. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p. 1680–1686, 2009.
- FIELDS, R. D.; LANCASTER, M. V. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. **Am Biotechnol Lab**, v. 11, p. 48–50, 1993.
- FINEZA, A. G. Avaliação da contaminação de águas subterrâneas por cemitérios: estudo de caso de tabuleiro-MG. Viçosa, Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade Federal de Viçosa, Trabalho de dissertação, 2008.
- FISKESJÖ, G. Technical methods section. Allium test I: a 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v. 8, p. 461–470, 1993a.
- FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **HEREDITAS**, v. 102, p. 99–112, 1985.
- FISKESJÖ, G. The Allium cepa in wastewater monitoring. **Environ. Toxicol. Water**, v. 8, p. 291–298, 1993b.
- FUSI, E.; BALDI, A.; CHELI, F.; REBUCCI, R.; AYUSO, E.; SEJRSEN, K.; PURUP, S. Effects of putrescine, cadaverine, spermine, spermidine and  $\beta$ -phenylethylamine on cultured bovine mammary epithelial cells. **Ital.J.Anim.Sci.**, v. 7, p. 131-140, 2008.
- FUSI, E.; ROSSI, L.; REBUCCI, R.; CHELI, F.; DI GIANCAMILLO, A.; DOMENEGHINI, C.; PINOTTI, L.; DELL'ORTO, V.; BALDI, A. Administration of biogenic amines to saanen

kids: effects on growth performance, meat quality and gut histology. **Small Ruminant Res.**, v. 53, p. 1-7, 2004.

GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; ŽEGURA, B.; NOVAK, M.; NUNIĆ, J.; BAJREKTAREVIĆ, D.; GARAJ-VRHOVAC, V.; FILIPIĆ M. Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 23, n. 15, p. 14739-50, 2016.

GALSTON, A. W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines in plant physiology. **Plant Physiol**, v. 94, p. 406–410, 1990.

GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. JR. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nat Rev Cancer.**, v. 4, n. 10, p. 781-92, 2004.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GOLLAPUDI, B. B.; MCFADDEN, L. G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 347, p. 97–99, 1995.

GÖMÜRGEN, A. N.; MUTLU, F. S. Bozcuk, Effects of polyamines (Putrescine, spermidine and spermine) on root tip mitosis and chromosomes in *Allium cepa* L. **Cytologia**, v. 70, n. 2, p. 217–224, 2005.

GONZALEZ, R. J.; TARLOFF, J. B. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. **Toxicol In Vitro**, v. 15, p. 257–9, 2001.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, V. 177, p. 751–766, 1949.

GRANT, W. F. Chromosomal aberration assays in *Allium*. A report of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutat. Res.**, v. 99, p. 273–291, 1985.

GRANT, W. F. Chromosome aberrations in plant as monitoring system. **Environ. Health Perspect.**, v. 27, p. 37–43, 1978.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutat. Res.**, v. 624, p. 107–112, 1999.

GRANT, W. F.; Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 110-8, 2004.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases – the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem.**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, 1974.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

- HANEBURGER, I.; FRITZ, G.; JURKSCHAT, N.; TETSCH, L.; EICHINGER, A.; SKERRA, A.; GERLAN, U.; JUNG, K. Deactivation of the *E. coli* pH stress sensor CadC by cadaverine. **J. Mol. Biol.**, v. 424, p. 15–27, 2012.
- HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H. J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 843–858, 2001.
- HAWEL, L. III, TJANDRAWINATA, R.R., FUKUMOTO, G.H.; BYUS C.V. Biosynthesis and selective export of 1,5-diaminopentane (cadaverine) in mycoplasma-free cultured mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 7412-7418, 1994.
- HEATHER, M.; WALLACE, A.; FRASER, V. HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem. J.**, v. 376, p. 1–14, 2003.
- HEDDLE, J. A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J. T. E.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 123, p. 61–118, 1983.
- HERRERO, O.; PÉREZ MARTÍN, J. M.; FERNÁNDEZ FREIRE, P.; CARVAJAL LÓPEZ, L.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, p. 20–24, 2012.
- HOBBS, C. A.; RECIO, L.; STREICKER, M.; BOYLE, M. H.; TANAKA, J.; SHIGA, A.; WITT, K. L. Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.**, v. 786-788, p. 172-81, 2015.
- 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 effluente. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 2090–2095, 2009.
- HUI, J. Y.; TAYLOR, S. L. Inhibition of in vivo histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine N-methyltransferase, and monoamine oxidase. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 81, p. 241–249, 1985.
- HUSSAIN, S. S.; ALI, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUE, K. H. M. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 300–311, 2011.
- HYUN-SU, K.; KANGJOO, K. Microbial and chemical contamination of groundwater around livestock mortality burial sites in Korea – a review. **Geosci. J.**, v. 16, p. 479–489, 2012.
- JANCEWICZ, A. L.; GIBBS, N. M.; MASSON, P. H. Cadaverine’s Functional Role in Plant Development and Environmental Response. **Front Plant Sci.**, v. 7, p. 870, 2016.
- KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, p. 219-230, 2005.
- KARPAS, Z.; LITVIN, O.; COHEN, G.; MISHIN, J.; ATWEH, E.; BURLAKOV, A. The reduced mobility of the biogenic amines: trimethylamine, putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. **Int. J. Ion Mobil. Spec.**, v.14, p. 3–6, 2011.
- KHUHAWAR, M. Y.; QURESHI, G. A. Review: polyamines as cancer markers: applicable separation methods. **J Chromatogr B**, v. 764, p. 385–407, 2001.

- KIRSCH-VOLDERS, M.; The CB in vitro micronucleus assay in human lymphocytes. **Mutation Research**, v.392, p.1-2, 1997.
- KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1–3, p. 315–328, 2004.
- KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 185–202, 1998.
- KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 155–166, 2000.
- KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWIŃSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 211–221, 2006.
- LEITE, E. B. Análise físico-química e bacteriológica da água de poços localizados próximo ao cemitério da comunidade de Santana, ilha de maré, Salvador-BA. **Candombá – Revista Virtual**, v. 5, n. 2, p. 132-148, 2009.
- LELI, I.T.; ZAPAROLI, F.C.M.; SANTOS, V.C.; OLIVEIRA, M.; REIS, F.A.G.V. Estudos ambientais para cemitérios: indicadores, áreas de influência e impactos ambientais. **Bol. Geogr.**, v. 30, n. 1, p. 45-54, 2012.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutat. Res.**, v. 650, p. 80–86, 2008.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutat Res.**, v. 682, p.71–81.
- LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, 471–486, 1938.
- LEWINSKA, A.; LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total antioxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 781-786, 2007.
- LIMAN, R.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and *Allium* test. **Chemosphere**, v. 80, p. 1056–1061, 2010.
- LIU, T.; DOBASHI, H.; KIM, D. W.; SAGOR, G. H. M.; NIITSU, M.; BERBERICH, T.; KUSANO, T. *Arabidopsis* mutant plants with diverse defects in polyamine metabolism show unequal sensitivity to exogenous cadaverine probably based on their spermine content. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 20, p. 151–159, 2014.
- LOZANO, J. G.; DALLA COSTA, C. A. M.; LABADESSA, A. S. As consequências sanitárias ocorridas pela contaminação do lençol freático por necrochorume: um estudo de caso no cemitério São Sebastião em Ariquemes-RO. **Revista Fiar: Revista do Núcleo de Pesquisa e Extensão**, v. 1 n. 1, p. 17-39, 2012.

- MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185–195, 1995.
- MACEDO, J. A. B. *Águas & Águas*. 2. ed. Belo Horizonte: **CRQ-MG**, 2004.
- MAGNANI, E.; BETTINI, E. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. **Brain Res Protoc**, n. 5, p. 266–72, 2000.
- MAISTRO, E. L. The in vivo rodent micronucleus test. L.M. Sierra, I. Gaivão (Eds.), *Genotoxicity and DNA Repair: a Practical Approach, Methods in Pharmacology and Toxicology*, **Springer Science+Business Media**, New York, p. 103–113, 2014.
- MANZANO, B. C.; ROBERTO, M. M.; HOSHINA, M. M.; MENEGÁRIO, A. A.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 22, n. 2, p. 1399–407, 2015.
- MAPANI, B. S.; SCHREIBER, U. Management of city aquifers from anthropogenic activities: example of the Windhoek aquifer, Namibia. *Phys. Chem. Earth*, v. 33, p. 674–686, 2008.
- MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of malei hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environ. Res.**, v. 94, p. 221–226, 2004.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 469–474, 1974.
- MARNETT, L. J. Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde. *Mut. Res.-Fund. Mol. Mech. Mutagen.*, v. 424, p. 83–95, 1999.
- MATOS, B. A. Avaliação da ocorrência e do transporte de microorganismo no aquífero freático do Cemitério Vila Nova Cachoeirinha, Município de São Paulo. 2001. 114 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- MATSUMOTO, S. T. Study on the Influence of Potentially Genotoxic Tannery Effluents on the Contamination of Water Resources in the Region of Franca-SP, Ph.D. Thesis. State University of São Paulo/São José do Rio Preto – SP, p. 216 (in Portuguese), 2004.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 29, p. 148–158, 2006.
- MATSUMOTO, S. T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, S. M.; MARIN-MORALES, M. M. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with Chromium, by the Comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v. 58, n. 1, 2005.
- MATTARAI, V. G. M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 42, n. 8, p. 1490–1496, 2012.
- MAVOURNIN, K. H.; BLAKEY, D. H.; CIMINO, M. C.; SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. **A**

- report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res.**, v. 239, n. 1, p. 29-80, 1990.
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecol Indic.**, v. 56, p. 60–69, 2015.
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13–18, 2011.
- MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. F.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. M. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4334–4340, 2010.
- MAZZEO, D. E.; MATSUMOTO, S. T.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1030-6, 2013.
- MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 60409–60455, 1969.
- McKELVEY-MARTIN, V. J.; GREEN, M. H. L.; SCHMEZER, P.; POOL-ZABEL, B. L., DE MÉO, M. P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. **Mutation Res.**, v. 288, p. 47–63, 1993.
- MOINARDA, C.; CYNOBERA, L.; DE BANDTA, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin Nutr.**, v. 24, p. 184–197, 2005.
- MORAIS, J. L.; SIRTORI, C.; ZAMORA, P. G. P. Tratamento de chorume de aterro sanitário por fotocatalise heterogênea integrada a processo biológico convencional. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, 2006.
- MORALES, M. M. Métodos alternativos a utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.
- NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **J. Immunol. Methods**, v. 204, p. 205–208, 1997.
- NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **J. Immunol. Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997.
- NEBELIN, E.; PILLAI, S.; LUND, E.; THOMSEN, J. On the formation of N-nitrosopyrrolidine from potential precursors and nitrite. **IARC Sci Publ**, v. 31, p. 183–193, 1980.
- NERSESYAN, A.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; MIŠÍK, M.; SETAYESH, T.; WULTSCH, G.; BONASSI, S.; THOMAS, P.; KNASMÜLLER, S. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by *in vivo* exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. **Mutation Research**, 2016.
- NUNES, E. A.; LEMOS, C. T.; GAVRONSKI, L.; MOREIRA, T. N.; OLIVEIRA, N. C. D.; SILVA, J. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v. 84, p. 47–53, 2011.

- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v. 267, p. 5421–6, 2000.
- OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, p. 23 – 29, 2006.
- OLIVE, P. L.; BANITH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the "Comet" assay. **Radiat. Res.**, v. 122, p. 86-94, 1990.
- OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANFITH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Exptl. Cell Res.**, v. 198, p. 259-260, 1992.
- OLIVEIRA, B.; QUINTEIRO, P.; CAETANO, C.; NADAIS, H.; ARROJA, L.; SILVA, E. F.; MATIAS, M. S. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. **Water Environ. J.**, v. 27, p. 99–106, 2013.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 123, p. 291–298, 1984.
- PACHECO, A. Os cemitérios e o ambiente. São Paulo: [s.n.], 2006.
- PAGÉ, B.; PAGÉ, M.; NOËL, C. A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. **Int. J. Oncol.**, v. 3, p. 473-476, 1993.
- PAIXÃO, R. L. Experimentação animal: razões e emoções para uma ética (tese). Rio de Janeiro, Fiocruz, 2001.
- PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M.; DOS SANTOS, G. L.; DAVIDE, L. C. Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 9, n. 133, p. 442-447, 2016.
- PATEL, S.; BAJPAYEE, M.; PANDEY, A. K.; PARMAR, D.; DHAWAN, A. *In vitro* induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. **Toxicol In Vitro**, v. 21, n. 8, p. 409–1418, 2007.
- PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D.; Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research**, v.490, p.209–214, 2001.
- PERROT, S.; DUTERTRE-CATELLA, H.; MARTIN, C.; WARNET, J.; RAT, P. A new nondestructive cytometric assay based on resazurin metabolism and an organ culture model for the assessment of corneal viability. **Cytometry**, Part A, v. 55<sup>a</sup>, p. 7–14, 2003.
- PFUHLER, S.; FELLOWS, M.; VAN BENTHEM J.; CORVI, R.; CURREN, R.; DEARFIELD, K.; FOWLER, P.; FRÖTSCHL, R.; ELHAJOUJI, A., LE HÉGARAT, L.; KASAMATSU, T.; KOJIMA, H.; OUÉDRAOGO, G.; SCOTT, A.; SPEIT, G. *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: summary of an IWGT workshop. **Mutat Res**, v. 723, n. 2, p. 101–107, 2011.
- POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling, **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1163–1182, 2004.

RANK, J.; LOPEZ, L. C.; NIELSEN, M. H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acedine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v. 36, p. 13–18, 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutat. Res.**, v. 312, p. 17–24, 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as tool in screening of the genotoxicity of complex mixture. **Hereditas**, v. 118, p. 49–53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutat. Res.**, v. 390, p. 121–127, 1997.

RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM, Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v. 428, p. 493–521, 2004.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RIBEIRO, J. C.; ANDRADE, S. F.; BASTOS, J. K.; MAISTRO, E. L. Avaliação do potencial genotóxico da fração clorofórmica de cascas do caule de *Austroplenckia populnea* em células de roedores *in vivo*. **Braz. J. Biol.**, v. 69, n. 4, p. 1141–1147, 2009.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagenese Ambiental**. 1 ed. Brasil: ULBRA, p. 355, 2003.

RIBEIRO, S. M. L.; CAMPOS, P.; TIRAPEGUI, J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. **Rev Farm Bioquím Univ São Paulo**, v. 31, n. 1, p. 21–8, 1995.

RODRIGUES, J. A.; TRAJANO, A. S. A.; NAVAL, L. P.; SILVA, G. G.; QUEIROZ, S. C. B. Avaliação preliminar do comportamento do aquífero freático no cemitério São Miguel do Município de Palmas. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Santa Catarina, 2003.

RODRIGUES, L.; PACHECO, A. Groundwater contamination from cemeteries cases of study. **Proceedings of Environmental 2010: Situation and Perspectives for the European Union**; Porto, Portugal., 2003.

RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–42, 2015.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317–320, 2003.

ROMANÓ, E. N. L. Cemitérios: passivo ambiental e medidas preventivas e mitigadoras, 2001.

ROTHFUSS, A.; O'DONOVAN, M.; BOECK, M.; BRAULT, D.; CZICH, A.; CUSTER, L. HAMADA, S.; PLAPPERT- HELBIG, U.; HAYASHI, M.; HOWE, J.; KRAYNAK, A. R.; VAN DER LEEDE, B. J.; NAKAJIMA, M.; PRIESTLEY, C.; THYBAUD, V.; SAIGO, K.; SAWANT, S.; SHI, J.; STORER, R.; STRUWE, M.; VOCK, E.; GALLOWAY, S. Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. **Mutat. Res.**, v. 702, p. 40–69, 2010.

- RUSSEL, P. J. Chromosomal mutation. B. Cummings (Ed.), Genetics, Pearson Education Inc., San Francisco, p. 595–621, 2002.
- RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principle of humane experimental technique. Londres: Ufaw, 1992.
- SALÉN, J. C. W. Animal models: principles and problems. In: Rollin BE, Kessel ML. The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species. 3rd.ed. Boston: CRC Press, 560p, 1995.
- SASAKI, Y. F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 30, p. 629–799, 2000.
- SAUNDERS, W. S.; SHUSTER, M.; HUANG, A.; GHARAIBEH, B.; ENYENIHI, A. H.; PETERSEN, I.; GOLLIN, S. M. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 303–308, 2000.
- SCHIPPER, R. G.; ROMIJN, J. C.; CUIJPERS, V. M.; VERHOFSTAD, A. A. Polyamines and prostatic cancer. **Biochem Soc Trans**, v. 31, p. 375–380, 2003.
- SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection. New York: Plenum Press, p. 31-53, 1975.
- SEVERINO, G.S. FOSSATI, I. A.; PADOIN, M. J.; GOMES, C. M.; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G. L.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases in females. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 489-498, 2004.
- SHAH, M. D.; IQBAL, M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 48, n. 12, p. 3345-53, 2010.
- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.
- SHAMINA, N. V.; SILKOVA, O. G.; SERIUKOVA, E. G. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. **Cell Biol. Int.**, v. 27, p. 657–664, 2003.
- SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell Biol.**, v. 140, p. 1307–1320, 1998.
- SHIMIZU, N.; SHIMUARA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutat. Res.**, v. 448, p. 81–90, 2000.
- SILVA, C. de O.; RODRIGUES, L. B. de O.; OLIVEIRA, R. S. Impactos ambientais causados pelo necrochorume do cemitério municipal da cidade de São José da Laje/AL. **Revista Científica do IFAL**, v. 3, n. 2, 2012.
- SILVA, R. W. da C.; MALAGUTTI FILHO, W. Cemitérios: fontes potenciais de contaminação. **Ciência Hoje**, v. 44, n. 263, p. 24-29, 2009.
- SINZELLE, L.; THURET, R.; HWANG, H. Y.; HERSZBERG, B.; PAILLARD, E.; BRONCHAIN, O. J.; STEMPEL, D. L.; DHORNE-POLLET, S.; POLLET, N.

- Characterization of a novel *Xenopus tropicalis* cell line as a model for in vitro studies. **Genesis.**, v. 50, n. 3, p. 316-24, 2012.
- SLOCUM, R. D.; FLORES, H. E. Biochemistry and physiology of polyamines in plants. **CRC Press**, Boca Raton, 1991.
- SNITKOFF, G. G. Testes biológicos. In: Gennaro AR. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.556-68, 2004.
- SOHAL, R. S.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 575–586, 2002.
- SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; Hartmann, A.; The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v.681, p.3-12, 2009.
- STRATTON, J. E.; HUTKINS, R. W.; TAYLOR, S. L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **J. Food Prot.**, v. 54, p. 460–470, 1991.
- STROHM, A. K.; VAUGHN, L. M.; MASSON, P. H. Natural variation in the expression of ORGANIC CATION TRANSPORTER 1 affects root length responses to cadaverine in *Arabidopsis*. **J. Exp. Bot.**, v. 66, p. 853–862, 2015.
- TABOR, C. W.; ROSENTHAL, S. M. Pharmacology of spermine and spermidine. Some effects on animals and bacteria. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 116, p. 139-155, 1956.
- TAKAHASHI, C.S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. In: Mutagênese Ambiental, Canoas: Ulbra, p. 151-172, 2003.
- TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vitro and in vivo assays. **Gen. Mol. Biol.**, v. 26, p. 551–555, 2003.
- TETI, D.; VISALLI, M.; MCNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)-physiological conditions. **J. Chromatogr. B**, v. 781, p. 107–149, 2002.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, p. 206–221, 2000.
- TIL, H. P.; FALKE, H. E.; PRINSEN, M. K.; WILLEMS, M. I. Acute and Subacute Toxicity of Tyramine, Spermidine, Spermine, Putrescine and Cadaverine in Rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 337-348, 1997.
- TSANGARIS, C.; VERGOLYAS, M.; FOUNTOULAKI, E.; GONCHARUK, V. V. Genotoxicity and oxidativ estress biomarkers in *Carassius gibelio* as endpoints for toxicity testing of Ukrainian polluted river waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2240–2244, 2011.
- TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. **Mutat. Res.**, v. 365, p. 147-159, 1996.
- TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Muta.**, v. 626, p. 4–14, 2007.
- ÜÇİSİK, A. S.; RUSHBROOK, P. The Impact of Cemeteries on the Environment and Public Health an Introductory Briefing. **World Health Organization Regional Office for Europe**, Nancy Project Office, Denmark, 1998.

- UMEGAKI, K.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. **Mutagenesis**, v. 15, n. 3, p. 261–269, 2000.
- VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178–189, 2006.
- VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem**, v. 266, p. 37–56, 2004.
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.
- VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutat Res.**, v. 392, n. 1-2, p. 31-43, 1997.
- VAN HUMMELEN, P.; KIRSCH-VOLDERS, M. An improved method for the in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes. **Mutation Res.**, v. 147, p. 29–36, 1990.
- VASQUEZ, M. Z. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. **Mutat Res**, v. 747, p. 142–156, 2012.
- VAUGHAN, V. C.; NOVY, F. G. Cellular toxins or the chemical factors in the causation of disease. **LEA BROTHERS & COMPANY PHILADELPHIA**, 4<sup>o</sup> Ed., New York, 1902.
- VENTURA-CAMARGO, B. de C.; DE ANGELIS D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-32, 2016.
- VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, p. 284–291, 2002.
- VOYTIK-Harbin, S. L.; BRIGHTMAN, A. O.; WAISNER, B.; LAMAR, C. H.; BADYLAK, S. F. Application and evaluation of the Alamar Blue assay for cell growth and survival of fibroblasts. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 34, p. 239–246, 1998.
- WHITE, M. J.; DICAPRIO, M. J.; GREENBERG, D. A. Assessment of neuronal viability with Alamar Blue in cortical and granule cell cultures. **J. Neurosci. Methods**, v. 70, p. 195–200, 1996.
- WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquat. Toxicol.**, v. 19, p. 137–161, 1991.
- ŽELJEŽIĆ, D.; MLADINIĆ, M.; ŽUNEC, S.; LUCIĆ VRDOLJAK, A.; KAŠUBA, V.; TARIBA, B.; ŽIVKOVIĆ, T.; MARJANOVIĆ, A. M.; PAVIČIĆ, I.; MILIĆ, M.; ROZGAJ, R.; KOPJAR, N. Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. **Food Chem Toxicol.**, 2016.
- ZHANG, H. X.; DU, G. H.; ZHANG, J. T. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, p.385–9, 2004.

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 153-163, 2004.

ZUME, J. T. Assessing the potential risks of burial practices on groundwater quality in rural north-central Nigeria. **J Water Health**, v. 9, n. 3, p. 609-16, 2011.

ŻYCHOWSKI, J.; BRYNDAL, T. Impact of cemeteries on groundwater contamination by bacteria and viruses – a review. **J. Water Health**, v. 13, p. 285–301, 2015.