

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 28/02/2024.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – 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 BIOCÊNCIAS – 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: Prof^ª. Dr^ª. 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	<p>Braga, Ana Paula Andrade</p> <p>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</p> <p>157 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales</p> <p>1. Citogenotoxicidade. 2. Contaminação de cemitérios. 3. Ecotoxicologia. 4. Necrochorume. 5. Bioindicadores. I. Título.</p>
-------	---

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.

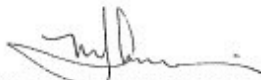
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

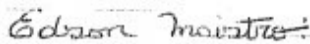
AUTORA: ANA PAULA ANDRADE BRAGA

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:



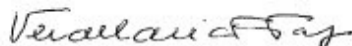
Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



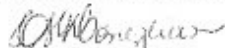
Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO (Participação Virtual)
Departamento de Fonoaudiologia / Unesp - Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília



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 denço.

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.

Enfim, 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 compõem 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 (CL₅₀ 9,5 mg. L⁻¹) que a putrescina (CL₅₀ 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* (CL₅₀ 335,5 mg. L⁻¹), em relação à putrescina (CL₅₀ 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 ($\text{LC}_{50} 9.5 \text{ mg. L}^{-1}$) than putrescine ($\text{LC}_{50} 36.7 \text{ mg. L}^{-1}$). In this test, potentiation of effects was not observed for associations of biogenic amines. Cadaverine also induced greater lethality for *D. rerio* ($\text{LC}_{50} 335.5 \text{ mg. L}^{-1}$).

¹) compared to putrescine (LC₅₀ 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 (LC_{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 (LC_{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 (LC_{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, alongação 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 (LC₅₀ 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 LC₅₀₋₁₀ (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 <i>Lactuca sativa</i>	35
3.8.2 <i>Allium cepa</i>	36
3.8.3 <i>Folsomia candida</i>	37
3.8.4 <i>Danio rerio</i>	39
3.8.5 <i>Daphnia magna</i>	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 <i>Allium cepa</i>	42
4.3.1 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos	43
4.4 Bioensaio com <i>Lactuca sativa</i>	44
4.5 Bioensaio com <i>Folsomia candida</i>	45
4.5.1 Teste comportamental de fuga	46
4.5.2 Teste de reprodução	47
4.6 Bioensaio com <i>Danio rerio</i>	47
4.6.1 Toxicidade aguda em embriões e larvas de zebrafish	48
4.7 Bioensaio com <i>Daphnia magna</i>	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 <i>Folsomia candida</i>	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, conseqüentemente, 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.

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 toxicidade 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* (CL₅₀ 9,5 mg. L⁻¹), quando comparado à PUT (CL₅₀ 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 CL₅₀ 335,5 mg. L⁻¹ e CL₅₀ 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 Cemeteries: 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 polyploidized 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-mbatiaiv 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 thanatobiome 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.