
Ciências Biológicas - Integral

GABRIEL BERTOLETTI BAROZZI

**AVALIAÇÃO CITOGENOTÓXICA DE ÁGUAS DE COVAS DE UM
CEMITÉRIO INUNDADAS POR ÁGUAS DO LENÇOL FREÁTICO,
E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE AMBIENTAL**



Rio Claro
2020

GABRIEL BERTOLETTI BAROZZI

**AVALIAÇÃO CITOGENOTÓXICA DE ÁGUAS DE COVAS DE UM CEMITÉRIO
INUNDADAS POR ÁGUAS DO LENÇOL FREÁTICO, E SUAS CONSEQUÊNCIAS
PARA A SAÚDE AMBIENTAL**

Orientador: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Coorientador: LETÍCIA ROCHA GONÇALVES

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

**Rio Claro
2020**

B267a

Barozzi, Gabriel Bertoletti

Avaliação citogenotóxica de águas de covas de um cemitério inundadas por águas do lençol freático, e suas consequências para a saúde ambiental /

Gabriel Bertoletti Barozzi. -- Rio Claro, 2021

41 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

Coorientadora: Letícia Rocha Gonçalves

1. Cemitérios. 2. Citotoxicidade. 3. Toxicologia genética. 4.
Bioindicadores. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais que me auxiliaram e permitiram que eu estudasse e morasse longe de casa, mas que mesmo longe sempre estiveram comigo.

Agradeço também à professora Dra. Maria Aparecida Marin Morales, que me recebeu em seu laboratório e permitiu que nele eu desenvolvesse uma pesquisa, sempre me apoiando com seu conhecimento e experiência. Também agradeço à Letícia Rocha Gonçalves, uma exemplar coorientadora sem a qual eu não teria conseguido terminar esse trabalho, sempre disponível e também disposta a me auxiliar.

Agradeço aos companheiros de laboratório, Adriana Correa, Leticia Gigeck, Nádia Corroqué, Lais Sommaggio, Jaqueline Matos, Cleiton Souza, Ana Paula, Ana Zullo, Letícia Rosa, Mariana Costa, Giovanna e Kemellyn, pelo apoio e auxílio nos experimentos.

Agradeço às pessoas que conheci na faculdade, especialmente à Giovanna Canizela, à Kemellyn Panchera, à Lívia Lenci e ao Guilherme Soares, por todos os momentos que passamos juntos desde o começo dessa jornada. Também agradeço ao Murilo Durigon, Isabela Reis, Maíra Minillo, Matheus Luqueta, Marco Branco, Andreza da Cunha, Mariana Pupo, Daniela Mayumi e aos meus amigos Scoobys. Quanto às pessoas que conheci no final da minha graduação, Isabela Negri, Isabella Franco e Luísa Lui, gostaria de ter compartilhado mais tempo com vocês. Obrigado por tudo.

Faria tudo de novo.

Avaliação citogenotóxica de águas de covas de um cemitério inundadas por águas do lençol freático, e suas consequências para a saúde ambiental

RESUMO

Os cemitérios são uma tradição que ganhou força em muitas religiões e ainda se mantém em várias culturas. Porém, seus impactos ao meio ambiente podem afetar o solo e os recursos hídricos de todo o entorno do local. É estimado que um corpo com massa de 70 kg libere cerca de 30 a 45 L de necrochorume, sendo esse considerado a causa mais relevante de poluição das necrópoles, por ter na sua constituição aminas biogênicas potencialmente citotóxica e carcinogênicas, como a cadaverina e a putrescina. Um agravamento dessa poluição pode ser observado, quando os cemitérios são instalados em ambientes úmido, por interferirem na decomposição dos corpos, prevalecendo no cadáver a etapa de saponificação. Por consequência disso, há dificuldade em fazer uso da mesma sepultura e os corpos podem tornar-se, por tempo, geradores de impactos ambientais. Exposições contínuas a substâncias citotóxicas e genotóxicas podem causar lesões tanto no citoplasma como no núcleo celular e, por essa razão, existe uma grande necessidade de se avaliar os possíveis impactos que cemitérios inadequadamente instalados possam promover ao meio ambiente, bem como os riscos à saúde ambiental. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de bioensaios realizados com os bioindicadores vegetais, *L. sativa* e *A. cepa*, a fitotoxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade da água presente em sepulturas inundadas pelo lençol freático do cemitério municipal São João Batista, da cidade de Leme-SP. Foram estudados dois tipos de sepulturas: uma que sofre inundação por toda a área da cova, onde a água está em contato com o corpo saponificado (P1); e outra na qual a água está presente mas não está em contato com o corpo saponificado (P2). As coletas das águas do P1 e do P2 foram realizadas na estação chuvosa. Não foram observadas neste estudo alterações que caracterizassem cito, geno e mutagenicidade das amostras, provavelmente pelos altos índices pluviométricos do período, que diluíram a concentração dos agentes poluidoras. Porém, pela prevalência do processo de saponificação, há mais de 12 anos, já se evidencia um grande impacto na decomposição dos corpos e problemas de ordem ecotoxicológicas, que possam estar sendo gerados no local.

Palavras-chave: Necrochorume, saponificação, fitotoxicidade, genotoxicidade, *L. sativa*, *A. cepa*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxa de germinação das sementes de <i>L. sativa</i> expostas aos controles negativo e positivo, ao P1 e ao P2	25
Tabela 2 – Resultados das medições do hipocótilo e da radícula do teste em <i>L. sativa</i>	25
Tabela 3 – Taxa de germinação das sementes de <i>A. cepa</i> expostas aos controles negativo e positivo, ao P1 e ao P2	27
Tabela 4 – Resultados dos índices de citotoxicidade, mutagenicidade, de genotoxicidade e de morte celular quando germinadas em CN, Trifluralina, MMS, P1 e P2 utilizando o bioindicador <i>A. cepa</i>	27
Tabela 5 - Resultados obtidos pelas análises de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> , as quais foram expostas ao controle negativo, Trifluralina, MMS e aos pontos de coleta P1 e P2.	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Situações de vulnerabilidade tendo em vista a permeabilidade do solo (Fonte: modificado de Silva, Malagutti Filho (2009)).....	10
Figuras 2 e 3 – Fotos do corpo saponificado e de seu rosto, respetivamente, sendo esse o cadáver que estava em contato com P1, o qual tinha sido sepultado há cerca de 10 anos e é um bom exemplo de corpo que sofreu do processo de saponificação. Foi posto uma tarja no lugar de seus olhos cobrindo os globos oculares completamente brancos devido ao processo de saponificação	13
Figura 4 - Esquema da raiz de <i>L. sativa</i> , destacando as regiões do hipocótilo e da radícula	17
Figuras 5 e 6 – 5: Local onde foi feita a coleta de água do lençol freático de P1, onde há água acumulada ao redor do caixão que possui um corpo saponificado; 6: Local onde foi feita a coleta de água do lençol freático de P2, cuja água não está em contato com o caixão, mas o corpo está saponificado, devido a alta umidade do solo do local. As setas verdes indicam os locais onde se encontram os líquidos coletados	20
Figura 7 - Amostras de raízes germinadas e suas medições, sendo elas CN (Controle Negativo); CP (Controle Positivo), P1 (Ponto de Coleta 1) e P2 (Ponto de Coleta 2).....	24
Figura 8 – Índice pluviométrico do município de Leme – SP. As barras azuis dispostas verticalmente representam o volume de chuva de acordo com cada mês e a linha vermelha a temperatura média.....	26
Figura 9 - Aberrações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> , após exposição em amostras de água coletadas em covas inundadas pelo lençol freático	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Contaminação dos cemitérios.....	7
1.2 Histórico e tipos de cemitérios.....	9
1.3. Decomposição cadavérica.....	10
1.4. Necrochorume.....	13
1.5. Bioindicadores vegetais para estudos toxicogenéticos.....	14
1.5.1. <i>Allium cepa</i>	15
1.5.2. <i>Lactuca sativa</i>	17
1.6. Área de estudo.....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Amostra testada.....	20
3.2. Material biológico.....	21
3.3. Métodos.....	21
3.3.1. Teste de fitotoxicidade em <i>L. sativa</i>	21
3.3.2. Teste de citogenotoxicidade em <i>A. cepa</i>	21
3.3.3. Análises estatísticas dos resultados.....	23
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS.....	36

1. Introdução

1.1. Contaminação dos cemitérios

Os cemitérios, embora sejam considerados fontes importantes de contaminação ambiental, ainda são pouco estudados, quanto aos impactos que possam causar tanto ao meio físico como biológico (ALMEIDA, 2005). Os impactos que os cemitérios causam ao meio ambiente podem atingir a biota edáfica e aquática, além de afetar também a população que vive em seu entorno (SILVA, 2006; BOCCHESI, 2012).

Os cemitérios, de maneira geral, eram construídos afastados das zonas residenciais, mas com o crescimento urbano as cidades acabaram se aproximando desses ambientes. O crescimento populacional leva ainda a outras consequências, como o aumento no número de óbitos e de sepultamentos, que gera mais decomposição e, então, maior poluição. (NECKEL et al., 2017). Ainda de acordo com Neckel *et al.* (2017), a proximidade entre os ambientes urbanos e de cemitérios é perigosa, pois expõe a população a mais um risco à saúde, devido ao alto potencial poluidor das necrópoles (NECKEL et al., 2017).

A contaminação de cemitérios acontece devido à percolação ou escoamento de um líquido derivado da putrefação cadavérica, denominado de necrochorume, o qual possui em sua composição substâncias que apresentam potencial tóxico para os seres humanos (PACHECO & MATOS, 2000 e NECKEL et al., 2017). Chuvas e substratos arenosos acabam por facilitar que o necrochorume percole no solo (SILVA e MALAGUTTI, 2009), promovendo a contaminação tanto desta malha ambiental como das águas subterrâneas (PACHECO, 2012).

O perigo dos cemitérios se deve ao seu potencial de acumular e liberar quantidades consideráveis de contaminantes gerados pela decomposição de corpos (NECKEL et al., 2017). Além do necrochorume, o processo de decomposição libera também outros contaminantes químicos e biológicos provenientes dos cadáveres. Muitas substâncias químicas do necrochorume estão relacionadas aos tratamentos de saúde que o cadáver sofreu ainda em vida ou também advindos de substâncias utilizadas para o processo de conservação do corpo, vestimenta e até mesmo da maquiagem feita no cadáver (ZYCHOWSKI E BRYNDAL, 2015). As urnas mortuárias também auxiliam na contaminação dos cemitérios, pois seus pregos, vernizes e pinturas passam por processo de decomposição, gerando contaminantes tóxicos. Somado a esses contaminantes citados, objetos presentes nas sepulturas, próteses e aparelhos dos cadáveres, como os marcapassos, podem conter na sua composição substâncias que também contaminam o ambiente (SILVA E FILHO 2011; FIEDLER et al. 2012).

Após a morte, o corpo entra em estado de putrefação, se transformando em um ecossistema constituído por artrópodes, bactérias, microrganismos patogênicos e destruidores

de matéria orgânica (BACIGALUPO, 2012). Dentre as contaminações biológicas, destacam-se os vírus e bactérias, mais especificamente as bactérias advindas da flora intestinal do indivíduo. Esses organismos promovem a decomposição, sendo responsáveis pela formação dos gases liberados pelo seu metabolismo (PACHECO & MATOS, 2000). Além disso, os fungos, que geralmente são mais encontrados no solo, também podem participar do processo de decomposição (PACHECO & MATOS, 2000; DENT, 2004). Esses micro-organismos podem ser carregados junto com o necrochorume, percolando no solo e atingindo as águas superficiais e subterrâneas, contaminando, assim, diferentes malhas ambientais (ZYCHOWSKI E BRYNDAL, 2015).

Algumas ações humanas também podem desencadear problemas estruturais no solo, que acabam interferindo no processo de percolação do necrochorume. O fato de cavar repetidas vezes o solo em processos de exumação ou de adicionar algum substrato antes do sepultamento faz com que a estrutura do solo também seja alterada, ficando mais propenso a aprisionar um maior volume de água que ali cai (KILLAM, 1990; HOLLAND, 1996; FIEDLER et al., 2003). O aumento do teor de água nos solos de cemitérios pode ter outras causas, como das águas de regar das plantas que decoram as sepulturas (FLEIGE et al., 2002; FIEDLER e GRAW, 2003), de ruptura de encanamento, excesso de chuvas e até mesmo de lençóis freáticos rasos. Em níveis freáticos mais rasos, a umidade do solo torna-se maior e a aeração diminui, conjugando um menor índice de zona não saturada, a qual serve de filtro biológico para contaminantes, de modo que quanto mais raso e úmido o solo, mais vulnerável à contaminação biológica (SILVA e MALAGUTTI, 2009).

O processo de decomposição cadavérica pode ser totalmente afetado pelo aumento de umidade do solo. Esse fato acarretará na prevalência de uma das etapas do processo de decomposição, chamada de saponificação e descrita nesse trabalho no item 1.3. A interferência citada inviabiliza o processo de exumação, a qual acarretará numa demanda por mais covas (FIEDLER e GRAW, 2003). Com isso, as sepulturas podem promover sérios danos ao meio ambiente e aos seres vivos que vivem no entorno das necrópoles (PACHECO, 2012). Considerando essa problemática dos cemitérios, fica evidente a necessidade de mais estudos nessa área, para uma melhor avaliação dos riscos que esses ambientes possam causar aos organismos ali expostos e à saúde humana.

1.2. Histórico e tipos de cemitérios

A palavra cemitério tem origem do grego Koumeterian e do latim Coemeteriune e significa dormitório, lugar onde se dorme, recinto onde se enterram ou se guardam os mortos e tem como sinônimos as palavras necrópole, carneiro, sepulcrário, campo-santo, cidade dos pés juntos e a última morada (CAMPOS, 2007).

Registros arqueológicos comprovam que a prática de sepultamento dos corpos se iniciou com o *Homo neanderthalensis*, mas essa prática também foi adotada pelo *Homo sapiens*. No início, o ato de sepultar consistia em cobrir os cadáveres com pedras (SILVA *et al.*, 2006), para evitar que esses fossem devorados por animais carnívoros e para proteger a população dos odores desagradáveis provenientes do processo de putrefação. Só posteriormente, no período

Mesolítico, surgiram os primeiros cemitérios. Inicialmente, esses locais supriam as necessidades da população, mas, conforme as covas eram usadas, surgiram novas demandas de uso, que levou a necessidade de uma constante reutilização das mesmas. Assim, a reutilização de covas se tornou comum, cuja prática ainda se mantém em várias culturas (PACHECO, 2012).

Atualmente, há dois principais tipos de sepultamento dos cadáveres, os realizados em cemitérios verticais e os em cemitérios horizontais. Nos cemitérios verticais, os corpos são sepultados sem contato com o solo, de forma sobreposta, o que confere uma maior facilidade para a manutenção e tratamento da área. Esse tipo de sepultamento ainda aumenta a própria capacidade de alocar corpos, não necessitando expandir horizontalmente, como os cemitérios horizontais (NECKEL *et al.*, 2017). Neste tipo de instalação, não há contato direto do solo com o necrochorume liberado no processo de putrefação. Também nesses ambientes há possibilidade de tratar os gases produzidos no processo de decomposição cadavérica, o que possibilita o abrandamento dos impactos ambientais decorrentes do ato de enterrar (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Já em cemitérios horizontais, forma mais comum de sepultamento, os cadáveres são alocados dentro de caixões e enterrados diretamente no solo (PACHECO, 2012). Nesse caso, quanto mais próximo o corpo fica da superfície, maior será a sua velocidade da decomposição, devido a maior aeração do sistema, que proporciona melhores condições biológicas para a biota relacionada com a decomposição. Porém, como consequência, promovem maior contaminação do meio ambiente, por terem os resíduos da decomposição expostos diretamente no solo e, possivelmente, nos corpos d'água, tornando mais difícil a possibilidade de tratamento dos resíduos. Consequentemente, esse tipo de cemitério promove um impacto ambiental mais danoso que os cemitérios verticais, além da necessidade de ocupar grandes áreas (ÜÇİSİK E RUSHBROOK, 1998; NECKEL *et al.*, 2017).

A contaminação do solo pelo necrochorume varia de acordo com o tipo de solo no qual o cemitério é instalado. Cemitérios com solos majoritariamente argilosos, apresentam maior capacidade de retenção de necrochorume, por serem mais compactos e impermeáveis, enquanto que em solos que possuem substratos predominantemente arenosos apresentam um maior potencial de contaminação, uma vez que os solos são mais porosos e permeáveis (SILVA; MALAGUTTI, 2009; ANJOS, 2013).

A vulnerabilidade de contaminação pela permeabilidade dos solos está representada pela Figura 1.



Figura 1 – Situações de vulnerabilidade, tendo em vista a permeabilidade do solo (Fonte: modificado de Silva, Malagutti Filho (2009)).

No Brasil, são comumente encontrados cemitérios horizontais. Para a instalação de um cemitério com covas horizontais, diversos estudos devem ser feitos para minimizar a contaminação ambiental. Para isso, é necessário avaliar as variáveis geológicas, hídricas e climáticas do local, as quais podem ser limitantes para a escolha de um cemitério ideal (OLIVEIRA et al., 2013). A escolha do local para se implantar um cemitério deve priorizar características que permitam uma melhor e mais rápida decomposição aeróbica como, por exemplo, locais secos, para que não haja emissão de odores desagradáveis e, conseqüentemente, atração de animais indesejáveis (OLIVEIRA et al., 2013).

1.3. Decomposição cadavérica

O processo de decomposição cadavérica tem início logo após a morte e, para melhor compreensão, convencionou-se dividi-lo em etapas. Apesar da decomposição se iniciar assim que ocorre o óbito, no geral só é possível perceber o processo de putrefação de um cadáver e os

processos de autólise entre 48 e 72 horas pós morte (DENT, 2004). Dentre os produtos da decomposição, está o necrochorume, o qual contém a cadaverina e a putrescina, substâncias fétidas e potencialmente tóxicas (DENT, 2004).

De acordo com Antonio et al. (2018) o processo de putrefação de cadáveres é subdividido em seis diferentes fases. A fase fresca, quando ainda não há liberação de necrochorume; a enfisematosa, quando há a formação de ácidos orgânicos, gases e aminas biogênicas, sem que haja a liberação destas para o meio; a coliquativa, quando já há extravasamento de grandes quantidades de necrochorume, devido a ruptura da pele; a de saponificação, onde ocorre a formação de uma camada de sais de ácidos graxos (sabão) em regiões do corpo onde há maior acúmulo de triglicerídeos; a esqueletização, onde as estruturas ósseas começam a se decompor. Nesta fase não ocorre mais a produção de necrochorume; e a de mineralização de tecidos mais resistentes.

Todo processo de decomposição está sujeito a variações, devido a fatores intrínsecos e extrínsecos, de forma que cadáveres em um mesmo período de tempo podem estar passando por distintas etapas de decomposição (FIEDLER e GRAW, 2003). Como evidenciado por Dent (2004), os fatores intrínsecos referem-se às características de composição corpóreas, como idade do cadáver, níveis de obesidade, causa mortis, estilo de vida, medicamentos e substâncias usadas pelo indivíduo ainda vivo e as que foram utilizadas para a conservação do corpo após a morte. Já os fatores extrínsecos, têm relação direta com as condições do local do sepultamento, como temperatura, umidade e ventilação. Por exemplo, a decomposição em locais com climas muito quentes e/ou pouco úmidos (desertos ou árticos) pode incorrer em processo de mumificação, geralmente relacionado à desidratação do tecido, que impede a proliferação da microbiota e, conseqüentemente, a decomposição do corpo (VASS, 2001). Neste caso, a decomposição pode se prolongar por muito tempo, não atingindo todas as fases do processo. Já em um ambiente arejado, a decomposição pode ser potencializada, devido ao aumento de ação de bactérias aeróbias.

As características dos solos, como presença de minerais, matéria orgânica, macro e microrganismos, influenciam de diferentes formas na maneira e no tempo de decomposição. Solos encharcados também interferem no terreno ao redor da cova, caracterizando uma espécie de tanque de conservação (DENT, 2004). Neste último caso, pode prevalecer a etapa de saponificação, o que aumenta a resistência à decomposição dos cadáveres, caracterizando-se em um sério problema cemiterial (WELL, 2016). Como a saponificação torna a decomposição mais tardia, ela também dificulta a exumação dos corpos e, conseqüentemente, a reutilização das covas (FIEDLER, 2003), o que prejudica a rotatividade de alguns cemitérios e acentua a

contaminação do solo local e das águas subterrâneas que servem às áreas residenciais vizinha.

A saponificação cadavérica é um processo onde ocorre uma transformação gordurosa e calcária do corpo, formando um tipo de cera de cor amarelo claro, odor rançoso e desagradável e de aspecto semelhante a sabão, denominada de adipocera, que confere ao cadáver uma característica disforme. A adipocera transforma quimicamente todos os tecidos do cadáver, conservando a pele e a morfologia corpórea como se a morte estivesse acabado de acontecer. As gorduras do corpo se transformam em glicerinas e ácidos graxos e estes, por sua vez, se combinam com álcalis originando sabões amoniacais, alcalinos terrosos e calcários, conferindo ao cadáver uma maior resistência à decomposição (PACHECO & MATOS, 2000). Ainda de acordo com o autor, a adipocera aparece cerca de 1 mês depois da exposição do corpo à água, sendo plenamente visível após 3 meses de exposição. A transformação completa requer cerca de 1 ano de exposição, sendo que, no início, o processo é reconhecido em alguns órgãos, mas no final todos apresentam-se identicamente comprometidos. Nesse processo, há um aumento do volume corporal, por tempo indeterminado, difícil de ser estimado, que é diretamente influenciado por uma gama de fatores, como disponibilidade de oxigênio, tipo de solo, presença ou não de água, temperatura, pH do meio e até mesmo o tipo de vestimentas do cadáver (FROENTJES, 1965; FIEDLER e GRAW, 2003; WELL, 2016).

Alguns autores citam ainda que existe uma relação direta do processo de saponificação com a quantidade da gordura corporal. Para alguns autores, os cadáveres femininos tendem a sofrer mais saponificação que os masculinos, pois as mulheres normalmente apresentam uma percentagem maior de gordura corporal que os homens (EVANS 1963; FROENTJES 1965; DIX e GRAHAM 2000; FIEDLER e GRAW, 2003). Além disso, para que a decomposição do tecido de um cadáver saponificado ocorra é importante que o ambiente tenha alguma forma de aeração (FROENTJES, 1965).



Figuras 2 e 3 - 2. Fotos do corpo saponificado; 3. Foto da cabeça do cadáver saponificado. Esse cadáver é referente ao P1, cujo sepultamento ocorreu há cerca de 12 anos, sendo um bom exemplo de corpo que sofreu processo de saponificação. (Fonte: foto realizada em 2018 no local de coleta, pelo próprio autor).

1.4. Necrochorume

O necrochorume é um líquido viscoso, de coloração castanho-acinzentada, rico em sais minerais, substâncias orgânicas e agentes patológicos (ALMEIDA, 2006), produzido durante o processo de decomposição cadavérica, e que apresenta um variável grau de patogenicidade (KEMERICH et al., 2012). As substâncias orgânicas do necrochorume, dentre elas as aminas biogênicas cadaverina e putrescina, são as responsáveis pelos fortes e desagradáveis odores desse exsudado (DENT, 2004; ALMEIDA, 2005). A produção de necrochorume é alta, pois, de acordo com Pacheco (2012), um corpo com massa de 70 kg libera cerca de 45 L desse composto. A sua composição é de 60% de água, 30% de substâncias mineralizadas e 10% de substâncias orgânicas (OLIVEIRA et al., 2013). A solução é rica em sais minerais, apresenta uma densidade média de 1,23 g/cm³ e um pH que varia de 5 a 9, em temperatura de 23 a 28 °C. O líquido produzido percola no solo, podendo alcançar camadas mais profundas do ambiente edáfico e até atingir as águas subterrâneas do local (PACHECO, 2012), fato esse que ainda se agrava nos períodos chuvosos e em terrenos arenosos (SILVA e MALAGUTTI, 2009). A presença de necrochorume nos solos aumenta os teores de sais nesses ambientes e pode também aumentar os das águas subterrâneas associadas (CASTROL, 2008). Estima-se que a liberação

de necrochorume dos corpos em decomposição pode acontecer até por 2,5 anos após o sepultamento (CASTROL, 2008).

As aminas biogênicas cadaverina e putrescina são moléculas de pequena massa molecular, presentes em todas as células vivas, tanto em animais quanto em plantas (UNAL; PALAVAN-UNSAL e TUFEKCI, 2008). Essas moléculas interferem nos processos de divisão celular, de modo que são observados altos níveis de poliaminas em locais com maior divisão celular, como nas raízes de vegetais (UNAL; PALAVAN-UNSAL e TUFEKCI, 2008). Entretanto, quando essas células são expostas à altos níveis de aminas exógenas, pode haver a indução de aberrações cromossômicas e a diminuir do índice mitótico dessas células (UNAL; PALAVAN-UNSAL e TUFEKCI, 2008). Os estudos desenvolvidos por esses autores mostraram que essas aminas promovem um efeito inibitório na divisão celular de células meristemáticas de *Allium cepa*. Ainda foram observadas outras alterações genotóxicas, como aberrações cromossômicas, do tipo pontes cromossômicas, aderências, C-metáfases, células binucleadas e micronúcleos.

As aminas biogênicas de modo geral, têm a capacidade de neutralizar as cargas negativas do fosfato presente no DNA, de modo a influenciar que esse se dobre e interaja melhor com suas proteínas, além de causar maior condensação do DNA. Caso as células sejam expostas a quantidades muito altas de aminas, essas podem promover interações prejudicadas de DNA/proteínas (UNAL; PALAVAN-UNSAL e TUFEKCI, 2008), por conta dos sítios nucleofílicos estabelecidos no DNA.

Considerando que o necrochorume é considerado a causa mais relevante de poluição das necrópoles, por conter substâncias químicas e agentes biológicos advindos do cadáver, além de derivados de artefatos mortuários (SILVA e MALAGUTTI, 2009 e ŻYCHOWSKI; BRYNDAL, 2015), reforça-se a potencialidade nociva que todas as áreas circundantes dos ambientes de cemitérios (SILVA e MALAGUTTI, 2009).

1.5. Bioindicadores vegetais para estudos toxicogenéticos.

Muitos bioindicadores vegetais são utilizados em avaliações ecotoxicogenéticas, por serem mais sensíveis que organismos de outras categorias taxonômicas, como, por exemplo, alguns animais (GOPALAN, 1999; VALERIO ET AL., 2007; CHARLES ET AL., 2011). Constantin e Owens (1982) citam que ensaios desenvolvidos com plantas apresentam vantagens porque, além das plantas apresentarem morfologia cromossômica similar a dos mamíferos e respondem a mutágenos de forma semelhante a outros eucarióticos, são menos onerosos e mais

simples de serem executados. A comprovação da eficiência de ensaios vegetais em monitoramento ambiental vem de estudos internacionais apoiados pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e também pela United States of Environmental Protection Agency (USEPA) (GRANT, 1999; MA, 1999; TURKOGLU, 2008). Soma-se a essas vantagens apresentadas o fato de que os bioensaios desenvolvidos com plantas não esbarram nas questões éticas de pesquisa científica.

A utilização de plantas como bioindicadoras já data de mais 60 anos atrás, sendo a *A. cepa* uma das pioneiras e tendo, a princípio, seu uso com o intuito de compreender efeitos mutagênicos de químicos e de radiação ionizante (GROVER e KAUR, 1999). Contudo, com as novas pesquisas, *A. cepa* vem adquirindo novas atribuições e hoje é utilizada também para avaliar o potencial mutagênico de poluentes ambientais (GROVER e KAUR, 1999).

O emprego dos testes de fitotoxicidade envolvendo plantas não era comum até a década de 1970. Com o aumento do uso de herbicidas, aumentaram os estudos de fitotoxicidade, os quais costumavam ser realizados com bioindicadores animais (WANG, 1991). Com o tempo, percebeu-se que os distúrbios causados pelos herbicidas eram mais impactantes na flora do que na fauna e, a partir da década de 80, aumentaram os estudos de toxicidade com bioindicadores vegetais (LYU et al., 2018).

As plantas oferecem bons resultados como bioindicadores para o estudo de poluentes presentes no solo, na água, em sedimentos e em resíduos líquidos ou sólidos (THOMAS et al., 1986; LYU et al., 2018). Estudos toxicogenéticos utilizam determinados vegetais para avaliações de poluentes, visto que as plantas são mais sensíveis aos modificadores ambientais que outros organismos (GOPALAN, 1999; VALERIO et al., 2007; CHARLES et al., 2011).

Como evidenciado por Constantin e Owens (1982) e confirmado por Grant (1982; e Grover e Kaur (1999), as plantas são organismos com morfologia cromossômica similar a dos mamíferos e outros organismos eucarióticos (na ordem de 75 a 90%), que respondem de forma semelhante a mutágenos, porém com a vantagem de serem menos onerosos e mais simples de serem desenvolvidos. Por essa razão, os ensaios desenvolvidos com vegetais vêm se destacando nesta área de estudo, sendo cada vez mais recomendado para monitorar e estudar áreas poluídas, principalmente em países em desenvolvimento, pelo baixo custo e adaptação à realização de testes in situ (GROVER e KAUR, 1999).

1.5.1. *Allium cepa*

A espécie *A. cepa* (cebola) é considerada um organismo teste eficiente para avaliar a

presença de substâncias mutagênicas em um ambiente (FISKESJÖ, 1985; CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008). Esse bioindicador possui características cromossômicas adequadas para tais estudos, como número cromossômico reduzido ($2n = 16$ cromossomos), de tamanho grande e estrutura homogênea, portanto de fácil visualização (GROVER e KAUR, 1999; ATEEQ et al., 2002; MATSUMOTO e MARIN-MORALES, 2004; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; LEME e MARIN-MORALES, 2008; MAZZEO, 2011). Os testes realizados com esse organismo possuem alta correlação com outros bioindicadores, como, por exemplo, os mamíferos (GRANT, 1982; CHAUHAN et al., 1999; GROVER e KAUR, 1999; CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008), fatores esses que aumentam a relevância dos resultados obtidos com esse vegetal. Os ensaios desenvolvidos com *A. cepa* são de baixo custo, de fácil manipulação (FISKESJÖ, 1985) e muito preditivos para estimar efeitos tóxicos, citogenotóxicos e mutagênicos.

Algumas substâncias tóxicas são capazes de interagir com o material genético e promover importantes alterações no ciclo celular, decorrendo, muitas vezes, na formação de cromossomos aberrantes (BAGATINI, SILVA e TEDESCO, 2007). Quando uma substância apresenta essa ação, ela é, convencionalmente, chamada de genotóxica (BAGATINI, SILVA e TEDESCO, 2007).

São escassos os métodos que avaliam danos referentes à exposição a mutágenos, principalmente os relacionados com análise de alterações cromossômicas, ensaios esses considerados importantes para avaliação de mutagenicidade (COSTA e MENK, 2000; BAGATINI, SILVA e TEDESCO, 2007). O sistema teste *A. cepa* mostra-se eficaz para avaliar os potenciais citotgenotóxicos de substâncias químicas e de amostras ambientais, por permitir uma exposição direta das raízes desse vegetal ao agente testado (BAGATINI, SILVA e TEDESCO, 2007). O teste de aberrações cromossômicas realizado com células meristemáticas de *A. cepa* vem sendo usado em diversas pesquisas, para estimar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, além de elucidar os mecanismos de ação de substâncias químicas e de amostras ambientais (FISKESJO, 1985; RANK; NIELSEN, 1993; 1997; BIANCHI et al., 2011, 2016; MAZZEO et al., 2015; VENTURA-CAMARGO et al., 2016). As células de meristema radiculares de *A. cepa* são eficientes para avaliar efeitos clastogênicos e ou aneugênicos, especialmente de contaminantes de água e solo (BAGATINI, SILVA e TEDESCO, 2007). Com isso, esse bioindicador é considerado um excelente organismo para ser usado em estudos de genotoxicidade e, conseqüentemente, biomonitorar os impactos da contaminação ambiental (EL SHAHABY et al., 2003).

1.5.2. *Lactuca sativa*

Um outro vegetal muito utilizado como bioindicador de impacto ambiental é a espécie *Lactuca. Sativa* (alface). Esse organismo é considerado um bom bioindicador de fitotoxicidade ambiental, por apresentar vantagens como, rapidez de respostas, simplicidade de execução, confiabilidade dos resultados e por serem testes baratos que não necessitam de equipamentos e infraestruturas sofisticadas para a sua realização (CHARLES, 2011; PRIAC, BADOT E CRINI, 2017), Outra vantagem ainda é que essa planta tende a ser muito sensível o estresse ambiental, quando comparadas com outros organismos (CHARLES et al., 2011).

Os bioensaios envolvendo esse vegetal são realizados por meio de testes de germinação e de crescimento/desenvolvimento do hipocótilo e da radícula (WANG et al., 2001; PALMIERI, 2014), após a exposição das sementes desta planta às amostras ambientais (PALMIERI, 2014). As estruturas da plântula de *L sativa* estão representadas na Figura 1.

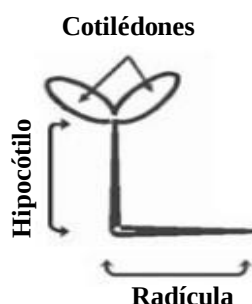


Figura 4 - Esquema da raiz de *L. sativa*, destacando as regiões do hipocótilo e da radícula. Fonte: Adaptado de Sobreno e Ronco, 2004.

A inibição do comprimento da raiz em *L. sativa* é considerada como um excelente indicador de toxicidade ambiental, especialmente no que se refere a amostras de solo e água (PRIAC, BADOT e CRINI, 2017). Embora outras espécies vegetais sejam também usadas em bioensaios de toxicidade ambiental (testes de alongamento de raízes) (SOBRERO e RONCO, 2004), os realizados com *L. sativa* se mostram mais adequados para esse tipo de análise, por serem mais sensíveis a efeitos de contaminantes (THOMAS et al., 1986; LYU et al., 2018).

1.6. Área de estudo

No cemitério municipal São João Batista da cidade de Leme-SP (localizado a 22.192257 e -47.409323), possui uma área destinada a sultamento de, aproximaamente, 67.706,86 m². Este cemitério apresenta uma condição inadequada, do ponto de vista geológixo, para a instalação de cemitérios, pois cerca de um quarto da sua área total apresenta lençol freático disposto mais superficialmente, o que faz com que as sepulturas deste local estejam continuamente inundadas. A inundação das covas atinge, em média, 5 cm da altura das urnas mortuárias, tendo essa quantidade de água aumentada nos períodos de chuva. Com isso, os corpos depositados nessa região de alta umidade têm o seu processo de decomposição dificultado, persistindo neles o processo de saponificação.

O líquido presente na sepultura, em contato com o corpo saponificado, pode conter substâncias químicas ou agentes biológicos que podem percolar continuamente pelo solo. Consequentemente, toda biota, tanto do solo como da água subterrânea, pode ser afetada. Além disso, durante o processo de exumação, os trabalhadores do local manipulam o cadáver e, consequentemente, o líquido presente nas urnas, o que se caracteriza em um grande risco a saúde dos mesmos. As más condições do cemitério podem colocar também em risco os visitantes da área, que podem se expor aos contaminantes derivados da decomposição cadavérica, uma vez que a exumação ocorre durante os horários de visita. Essa preocupação se baseia nas citações de Bagatini (2007), que afirmam que organismos que estão sujeitos a exposições contínuas de substâncias genotóxicas e/ou mutagênicas podem apresentar lesões celulares precursoras de processos carcinogênicos e/ou de morte celular.

Considerando que instalação de cemitérios em locais inapropriado, como as áreas próximas a corpos d'água superficiais, terrenos acidentados, solos inadequados (como os encharcados), grande proximidade com áreas urbanas, associado também a erros na forma como os cadáveres são manipulado e, consequentemente, a existência da possibilidade das necrópoles desencadearem severos impactos sócio ambientais (SILVA, 2006), o presente projeto avaliou a fitotoxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade de amostras de água de urnas mortuárias inundadas pelo lençol freático, do cemitério municipal São João Batista, da cidade de Leme-SP. Foram avaliados dois tipos de amostras de águas: sepultura inundadas por águas do lençol freático, que estão em contato com o corpo saponificado; sepultura que contém água, mas está não está em contato com o cadáver, porém mantém a umidade da área, causando também a conservação do estado de saponificação. Em ambas os pontos de coleta, os corpos estão sepultados há, aproximadamente, doze anos.

- **Objetivos**

Neste estudo foram avaliadas a fitotoxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade de amostras de água coletadas em sepulturas do cemitério municipal São João Batista da cidade de Leme-SP, que se encontram inundadas, por cerca de 12 anos, por águas do lençol freático, sob duas condições distintas: sepultura com toda a área da cova inundada (água em contato com o corposaponificado); sepultura que contém água, mas esta não está em contato com o cadáver, porém mantém a umidade da área suficiente para conservar o corpo no estado de saponificação.

2.1. Objetivos específicos

- Realizar coletas de amostras de água em dois tipos de sepulturas que contém cadáver saponificado: a que contém a água imersa junto ao corpo; e a que contém água, mas sem estar em contato com o corpo sepultado;
- Avaliar o potencial fitotóxico das águas coletadas nas sepulturas, por meio dos testes de germinação e de alongamento da raiz e do hipocótilo, sendo realizados ambos os testes com o bioindicador *L. sativa* e o de germinação em *A. cepa*;
- Avaliar o potencial citotóxico das águas coletadas nas sepulturas descritas acima, por meio do teste de Índice Mitótico com *A. cepa*;
- Avaliar os potenciais genotóxicos e mutagênicos das águas coletadas nas sepulturas descritas acima, por meio dos testes de Aberrações Cromossômicas e do Micronúcleo com *A. cepa*.

- **Materiais e métodos**

3.1. Coleta das amostras testadas

As coletas da água de sepulturas de áreas inundadas do cemitério São João Batista (Leme-SP) foram realizadas em dezembro de 2018. O ponto 1 (P1) refere-se à sepultura que contém água em contato com o corpo saponificado e o ponto 2 (P2) é referente a água de sepultura que não está em contato com o corpo, mas que mantém a umidade do mesmo suficiente para a manutenção do processo de saponificação.



Figura 5 e 6 - 5. Local onde foi feita a coleta de água do lençol freático de P1, onde há água acumulada ao redor do caixão que possui um corpo saponificado; 6. Local onde foi feita a coleta de água do lençol freático de P2, cuja água não está em contato com o caixão, mas o corpo está saponificado, devido a alta umidade do solo do local. As setas verdes indicam os locais onde se encontram os líquidos coletados.

3.2. Material Biológico utilizado nos bioensaios

Para a realização dos bioensaios, foram utilizadas sementes de *L. sativa* (variedade Grand Rapids) e de *A. cepa* (variedade Baia periforme), bioindicadores usualmente usados no laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

3.3. Métodos aplicados

3.3.1. Teste de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

A fitotoxicidade das amostras de águas coletadas nas sepulturas foi avaliada por meio dos testes de germinação e de alongamento de raízes/hipocótilos, realizados com o organismo teste *Lactuca sativa*. Para realizar estes testes, 20 sementes de *L. sativa* foram dispostas em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido com 4 mL das águas coletadas e filtradas do P1 e P2. A filtração foi realizada com o auxílio de um funil com papel filtro para a retirada de material particulado da amostra bruta. O controle negativo (CN) foi realizado com água de osmose reversa e o controle positivo (CP) com uma solução de ZnSO_4 (LOPES, 2014). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As placas com as sementes foram colocadas na BOD sem fotoperíodo no escuro (PALMIERI, 2014), a 22 °C por 120 horas. Passado esse período, foram realizadas as contagens do número de sementes germinadas. Após a contagem das sementes germinadas, as placas de Petri contendo as plântulas foram congeladas, para facilitar a mensuração dos comprimentos das raízes e dos hipocótilos. As medidas dessas estruturas foram tomadas com o auxílio de um paquímetro. Posteriormente, as médias dos resultados das mensurações de cada placa/tratamento e do CP foram comparadas com as do CN, para avaliar as condições de crescimento da planta, pós exposição às amostras contaminadas.

3.3.2. Teste de citogenotoxicidade em *Allium cepa*

Para o teste de citogenotoxicidade, foram distribuídas cem sementes de *A. cepa* em placas de Petri forradas com papel filtro, embebido com 4 mL das águas coletadas e filtradas do P1 e P2. O teste controle negativo (CN) foi realizado com água de osmose reversa e os controles positivos (CP) com o herbicida trifluralina (droga de ação aneugênica), na concentração de 0,84ppm de princípio ativo e com Metil metanosulfonato (MMS) (droga de ação clastogênica), na concentração de $4 \cdot 10^{-4}$ M. As placas foram dispostas em BOD, com fotoperíodo de 12 horas, por 5 a 7 dias, até que as raízes germinadas atingissem cerca de 2 cm de comprimento. Após este período, foi feita a contagem do número de sementes germinada, as radículas presentes

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

Depois dessa etapa, as sementes já fixadas passaram por processos de três lavagens de cinco minutos cada em água destilada, para a retirada do excesso de fixador e, em seguida, expostas à hidrólise em ácido clorídrico 1N a 60°C, por cerca de dez minutos. Após a hidrólise, as radículas passaram por três banhos de 5 minutos cada em água destilada, para a retirada do resíduo de HCl. Na sequência, as radículas foram imersas em reativo de SCHIFF, por cerca de duas horas, em ambiente escuro (frasco âmbar, colocado em caixa preta fechada). Após a coloração, foram feitos mais três banhos em água destilada, com duração de cerca de cinco minutos cada, para retirar o excesso de corante, e as raízes foram utilizadas na confecção das lâminas.

As regiões meristemáticas das radículas foram seccionadas em lâmina, com auxílio de um bisturi ou lâmina de aço, e contra coradas com uma gota de Carmim acético (2%). O material foi recoberto com lamínulas e suavemente esmagado por pressão mecânica. Posteriormente, as lamínulas foram extraídas em Nitrogênio líquido (LN₂) e as lâminas deixadas a temperatura ambiente, até a total secagem, para, posteriormente, receberem uma gota de resina sintética. As lâminas foram recobertas com uma nova lamínula limpa e seca e deixadas a temperatura ambiente, até a secagem da resina, para serem então utilizadas nas análises microscópicas.

Foram confeccionadas quatro lâminas por réplica, totalizando 12 lâminas, e analisadas quinhentas células por lâmina, totalizando 6.000 células contadas para cada tratamento e para cada teste controles (negativo e positivo). As contagens foram usadas para a obtenção dos resultados referentes aos índices mitóticos, interfásico, genotóxico, mutagênico e de morte celular, que foram calculados conforme fórmulas descritas a seguir:

- Índice mitótico (IM):

$$IM = \frac{\text{Número de células em divisão}}{\text{Número de células observadas}} \times 100$$

- Índice de morte celular (IMC):

$$IMC = \frac{\text{Número de células em morte celular}}{\text{Número de células observadas}} \times 100$$

- Índice de Genotoxicidade (IG):

$$IG = \frac{\text{Número de células com aberrações cromossômicas}}{\text{Número de células observadas}} \times 100$$

- Índice de Mutagenicidade (IMut):

$$IMut = \frac{\text{Número de células com micronúcleo}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

3.3.3. Análises estatísticas dos resultados

Para análise dos resultados foram aplicados testes estatísticos. Primeiramente, foi aplicado o teste de normalidade (Shapiro Wilk) e, então, o teste de homogeneidade de Levene.

Como os resultados dos ensaios com *L. sativa* e *A. cepa* não apresentaram distribuição normal e nem homogênea, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis.

4. Resultados

O índice pluviométrico registrado para o município de Leme-SP, no mês de dezembro, foi o terceiro maior valor registrado para o ano de 2018. Dessa maneira, os nossos resultados podem estar refletindo uma maior diluição dos contaminantes derivados dos exsudados corpóreos. Os dados pluviométricos estão apresentados na figura 8.

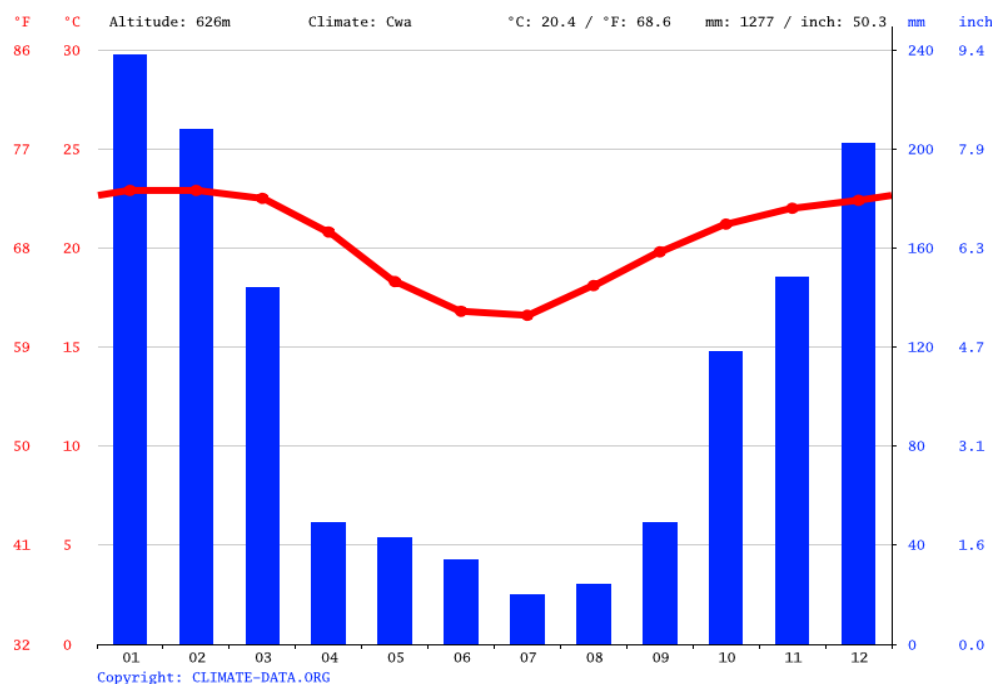


Figura 7 – Índice pluviométrico do município de Leme-SP. As barras azuis dispostas verticalmente representam o volume de chuva de acordo com cada mês e a linha vermelha a temperatura média. Fonte: <https://pt.climate-data.org/americas-do-sul/brasil/sao-paulo/leme-10673/#climate-graph> Acessado em 12/11/2020.

Os resultados obtidos no teste de germinação com sementes de *L. sativa* mostraram que os tratamentos não diferiram significativamente dos resultados do teste CN (Tabela 1), indicando que as águas coletadas em ambas as sepulturas não apresentaram fitotoxicidade para esse bioindicador.

Tabela 1 – Taxa de germinação das sementes de *L. sativa* expostas às amostras de águas coletadas no P1 e P2 e aos controles negativo e positivo.

Tratamento	% de Germinação		
	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3
CN	90	85	90
ZnSO₄7H₂O	85	85	80
Ponto 1	95	100	95
Ponto 2	100	90	85

CN: Controle negativo; ZnSO₄: Sulfato de Zinco (controle positivo - CP); P1: Local de coleta onde o líquido se encontrava em contato com o corpo saponificado; P2: Local de coleta onde o líquido se encontrava próximo ao corpo saponificado.

Os resultados do teste de alongamento do hipocótilo e da radícula, realizados com *L. sativa*, mostraram que os valores obtidos neste teste para as amostras de água coletada no P1 e P2 não apresentaram diferenças significativo, em relação ao CN (Tabela 2, Figura 9).

Tabela 2 – Resultados obtidos no teste de alongamento do hipocótilo e das radículas de *L. sativa*, para os controles negativo e positivo e para os tratamentos realizados com as amostras de águas coletadas no P1 e P2.

Tratamento	Hipocótilo	Radícula
CN	17,6 ± 1,6	8,78 ± 0,87
ZnSO₄7H₂O	-	-
Ponto 1	20,5 ± 1,16	23,12 ± 2,4
Ponto 2	19,62 ± 0,96	22,3 ± 2,7

CN: Controle negativo; P1: Local de coleta onde o líquido se encontrava em contato com o corpo saponificado. P2: Local de coleta onde o líquido se encontrava próximo ao corpo saponificado. A unidade de medida utilizada foi em milímetros.

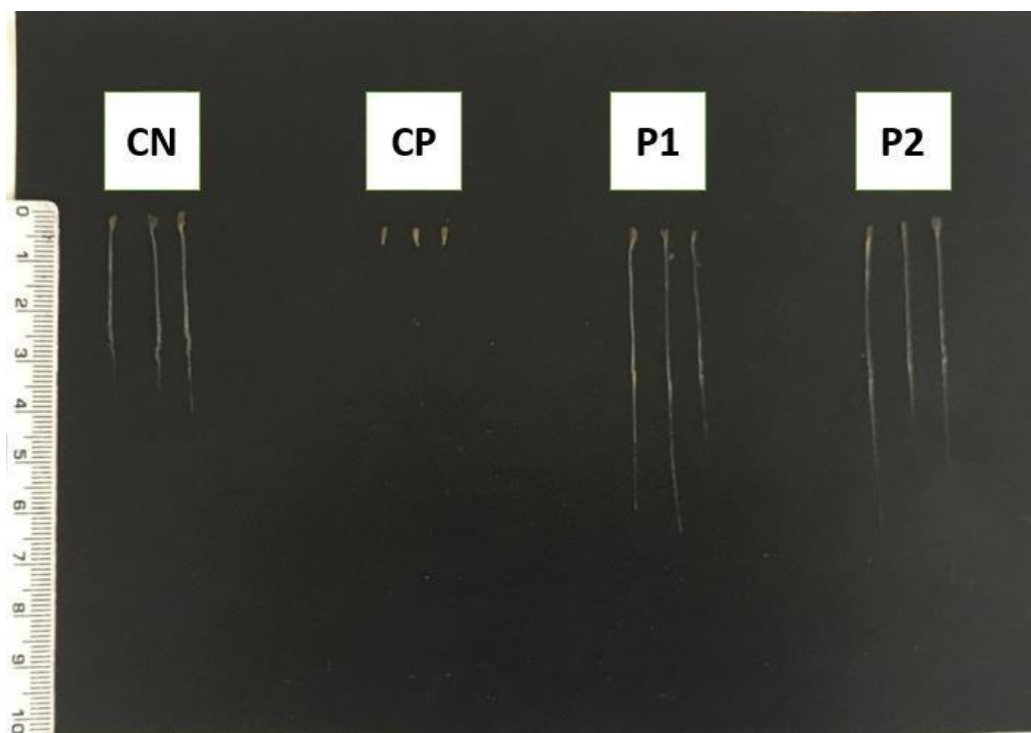


Figura 8 - Aspecto do desenvolvimento das raízes, teste de alongamento. CN. Controle negativo (exposição das sementes em água destilada); CP. Controle positivo (exposição das sementes em ZnSO_4); P1. P1: exposição das sementes em amostras de água coletada na sepultura 1 (Local de coleta onde o líquido se encontrava em contato com o corpo saponificado); P2. exposição das sementes em amostras de água coletada na sepultura 2 (Local de coleta onde o líquido se encontrava próximo ao corpo saponificado).

Os resultados das taxas de germinação das sementes de *A. cepa* expostas às amostras de águas coletadas nas sepulturas (P1 e P2) exibiram médias de índices de germinação iguais ou superiores a 70%. Pela análise estatística (Kruskal-Wallis, seguida da comparação múltipla de Dunn), nenhum dos tratamentos apresentou diferença estatisticamente significativa, em relação aos dados do CN, dados estes que demonstram que as amostras de águas das sepulturas estudadas não apresentaram potencial tóxico para *A. cepa*.

Tabela 3 – Taxa de germinação das sementes de *A. cepa* expostas às amostras de águas coletadas no P1 e P2 e aos controles negativo e positivo

Tratamento	% de Germinação		
	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3
CN	73	74	76
Trifluralina	53	56	60
MMS	75	67	79
P1	80	68	76
P2	75	71	74

CN: Controle negativo; Trifluralina e MMS foram usados como controle positivo; P1: Local de coleta onde o líquido se encontrava em contato com o corpo saponificado; P2: Local de coleta onde o líquido se encontrava próximo ao corpo saponificado.

Como pode ser visto na tabela 4, os resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos tratamentos realizados com amostras de águas das sepulturas do P1 e do P2, não se mostraram diferentes significativamente do CN, o que infere que as amostras de água testadas não são potencialmente citogenotóxicas nem mutagênicas para esse bioindicador. As análises de aberrações cromossômicas realizadas neste estudo registraram algumas alterações cromossômicas nas células expostas às águas das sepulturas (Figura 9), mas os resultados não se mostram estatisticamente significativos, em relação aos observados no CN. Durante a análise, não foram observados índices de Morte Celular.

Tabela 4 – Resultados dos ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade, de genotoxicidade e de morte celular, realizadas com o bioindicador *A. cepa*, exposto a águas coletadas em sepulturas inundadas pelo lençol freático, do cemitério São João Batista da cidade de Leme-SP.

Tratamento	Índice Mitótico (citotoxicidade)	Índice de Mutagenicidade	Índice de Genotoxicidade	Índice de Morte Celular
CN	42,5 ± 4,15	0,19 ± 0,14	0,065 ± 0,095	0,00 ± 0,00
Trifluralina	41,9 ± 4,45	1,53 ± 1,22*	1,12 ± 1,31*	0,00 ± 0,00
MMS	43 ± 3,95	1,25 ± 1,22*	0,3 ± 0,322	0,00 ± 0,00
P1	42,25 ± 4,61	0,5 ± 0,37	0,14 ± 0,16	0,00 ± 0,00
P2	41 ± 2,39	0,46 ± 0,3	0,28 ± 0,2	0,00 ± 0,00

CN: Controle negativo; Trifluralina e MMS foram usados como controle positivo (CP); P1: Local de coleta onde o líquido se encontrava em contato com o corpo saponificado; P2: Local de coleta onde o líquido se encontrava próximo ao corpo saponificado. *:significativo para $p < 0,05$.

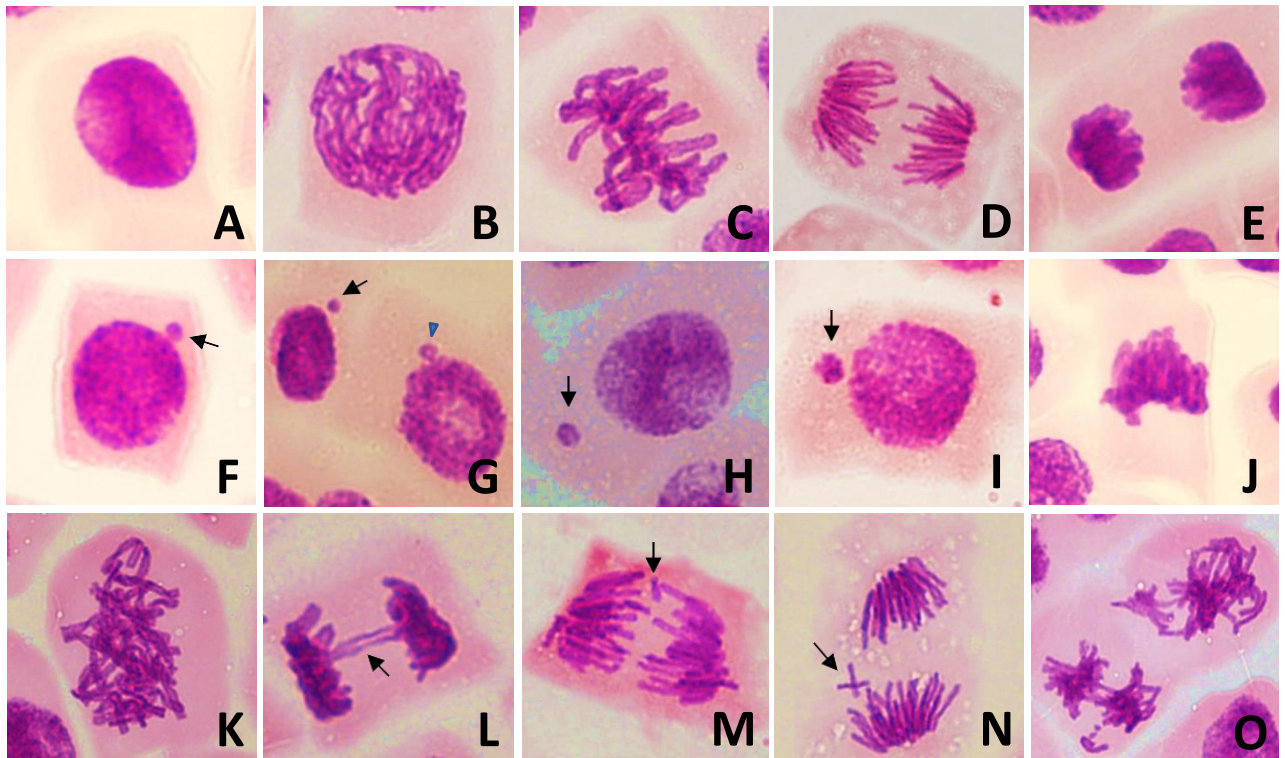


Figura 9 - Aberrações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição em amostras de água coletadas em covas inundadas pelo lençol freático. A: Interfase normal; B: Prófase normal; C: Metáfase normal; D: Anáfase normal; E: Telófase normal; F: Interfase com broto nuclear (seta); G: Interfases com micronúcleo (seta) e prófase com broto nuclear (cabeça de seta); H: Interfase com micronúcleo (seta); I: Prófase com micronúcleo; J: Metáfase com aderência cromossômica; K: Metáfase poliplóide; L: Anáfase com pontes cromossômica (seta); M: Anáfase com quebra cromossômica (seta); N: Anáfase com perdas cromossômicas (seta); O: Anáfase multipolar.

Tabela 5 - Resultados obtidos nas análises de aberrações cromossômicas com células meristemáticas de *A cepa*, que foram expostas às amostras de águas coletadas nas sepulturas impactadas pelo lençol freático, no cemitério São João Batista da cidade de Leme–SP (P1 e P2).

Tratamento	Broto Nuclear	Células Polinucleada	Células com Núcleos Lobulados	Células Poliplóide	Aderência Cromossômica	Ponte Cromossômica	Perda Cromossômica	C-Metáfase	Metáfase Poliplóide	Multipolaridade
CN	0,03 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Trifluralina	0,22 ± 1,64	0,015 ± 0,29	0,27 ± 1,97	0,11 ± 2,02	0,05 ± 0,45	0,09 ± 0,79	0,05 ± 0,45	0,13 ± 0,98	0,06 ± 1,15	0,05 ± 0,62
MMS	0,14 ± 0,97	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,62	0,06 ± 0,77	0,03 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,015 ± 0,29	0,00 ± 0,00
Ponto 1	0,03 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,016 ± 0,29	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,97 ± 0,67	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ponto 2	0,14 ± 0,86	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,016 ± 0,29	0,016 ± 0,29	0,05 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

CN: Controle negativo, Trifluralina: Controle positivo; MMS: Controle positivo; P1: Local de coleta onde o líquido se encontrava em contato com o corpo saponificado; P2: Local de coleta onde o líquido se encontrava próximo ao corpo saponificado.

5. Discussão

Os cemitérios estão entre as principais fontes antrópicas de poluição e contaminação de recursos hídricos localizados próximos às áreas urbanas. Por essa característica poluidora que apresentam, esses ambientes representam uma séria ameaça à qualidade ambiental (SILVA et al., 2011 e ZYCHOWSKI e BRYNDAL, 2015). Do ponto de vista toxicológico, esses ambientes são ainda pouco estudados e, por isso, tais avaliações são muito interessantes para um melhor conhecimento dos possíveis impactos que as necrópolis possam desencadear sobre o ambiente urbano e, conseqüentemente, os riscos para a população diretamente envolvidas com esses locais, como funcionários funerários, moradores do entorno dos cemitérios e visitantes desses espaços.

A Ecotoxicologia é um ramo da toxicologia que avalia os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos, sobre quaisquer constituintes do ecossistema: animais (incluindo seres humanos), vegetais ou microrganismos, em um contexto integral (TRUHAUT, 1977). A ecotoxicologia também é conhecida como um dos ramos da ecologia, voltada a estudos dos efeitos e das influências de agentes tóxicos sobre diversos níveis de organização biológica (celular, individual, populacional, da comunidade e do ecossistema). Os estudos ecotoxicológicos também avaliam as características tóxicas e os efeitos biológicos de amostras ambientais complexas, resultantes tanto de eventos naturais como de ação antropogênica, nas mais variadas malhas ambientais (ar, solo, água e sedimento) (NEWMAN; UNGER, 2002).

Alguns vegetais, como a espécie *A. cepa* e *L. sativa*, são considerados excelentes bioindicadores de contaminação ambiental (TIGRE et al., 2012). Análises simultâneas, realizadas com esses dois organismos permitem uma maior compreensão dos mecanismos de ação de substâncias tóxicas e também avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico de um poluente ou de uma amostra ambiental (ARAGAO et al., 2015; FREITAS et al., 2016). A espécie *L. sativa* é considerada, por várias organizações internacionais, como um excelente bioindicador para avaliações ecotoxicológicas (ISO, 1995), devido à facilidade e rapidez de desenvolvimento dos testes e baixo custo operacional, além de apresentar também uma alta sensibilidade à ação tóxica de contaminantes, portanto, muito eficiente para este fim (CHARLES et al., 2011; PALMIERI, 2014). No presente estudo, foram avaliados, com esse vegetal, os índices de germinação e de crescimento, tanto do hipocótilo quanto da radícula.

Conforme foi apresentado na Tabela 1, não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos nos testes de germinação com *L. sativa* para os tratamentos com águas coletadas nas sepulturas com corpos mantidos em estado de saponificação e o teste CN.

Esses resultados negativos podem estar associados à alta pluviosidade do período de coleta (figura 8) que provavelmente pode ter promovido uma maior diluição dos contaminantes oriundos da decomposição cadavérica. Essa explicação pode ser reforçada pelas citações de Sobrero e Ronco (2004) que afirmam que compostos hidrossolúveis, em baixas concentrações, podem não afetar a germinação de plantas. Os resultados obtidos nos testes de desenvolvimento das raízes de *L. sativa*, baseados nos índices de elongação do hipocótilo e da radícula, realizados com as amostras dos P1 e P2, assim como o observado nos testes de germinação (Tabela 2), não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao CN, confirmando que as amostras avaliadas não apresentaram potencial tóxico para *L. sativa*. Além disso, não foram observadas necroses nas radículas ou aumentos consideráveis na zona pilífera, que são efeitos associados à ação de agentes tóxicos. Considerando que, tanto no P1 como no P2, ocorre um maior acúmulo de água nas covas em razão das chuvas, destacamos que essa água acumulada em maior volume pode ter sofrido uma maior diluição dos compostos derivados da putrefação cadavérica, não induzindo efeitos fitotóxicos no bioindicador *L. sativa*. Outro fator que comprovou a confiabilidade e sensibilidade do teste de toxicidade realizado com *L. sativa*, foram as respostas do CP para germinação e para desenvolvimento radicular. Não foram observados para o CP alongamento da radícula e do hipocótilo, o que confirma que o bioindicador está respondendo a efeitos tóxicos, pois o $ZnSO_4$ (CP), na concentração usada, corresponde a uma solução inibidora do crescimento de raízes (LOPES, 2014).

Para análises da germinação com *A. cepa*, o P1 e P2 apresentaram uma média acima de 70% de germinação (Tabela 3), não diferindo estatisticamente do teste CN. Pelos ensaios realizados com o CP trifluralina, ficou comprovado a confiabilidade do resultado obtido neste ensaio, pois, de acordo com alguns autores, substâncias tóxicas podem inibir divisão celular e ser prejudicial para as plantas, especialmente pelos impactos causados aos meristemas radiculares (DEUBER, 1992), como é o caso do herbicida trifluralina (FERNANDES et al., 2007).

De acordo com Cabrera e Rodrigues (1999), a espécie *A. cepa* é um excelente bioindicador para avaliar alterações citotóxicas (índice mitótico e índice de morte celular), genotóxicas (aberrações cromossômicas) e mutagênicas (micronúcleo). O índice mitótico permite avaliar a citotoxicidade de uma substância, pela análise do número de células nas diversas fases do ciclo celular (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Nas nossas análises, tanto o P1 quanto o P2 não apresentaram alterações estatisticamente significativas, em relação ao CN, como demonstrado na Tabela 4, não evidenciando citotoxicidade das amostras de água analisadas.

O teste de aberrações cromossômicas (C-metáfases, metáfases poliploides, atrasos, perdas e pontes cromossômicas, multipolaridade, células polinucleadas, brotos nucleares, núcleos lobulados dentre outros), observadas nas fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase, bem como na interfase, avaliam o potencial de um agente promover dano ao material genético, o que permite estimar a sua genotoxicidade (FERNANDES, et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO et al., 2011; SOUZA et al., 2014). Por este teste, não foram encontrados resultados estatisticamente diferentes entre as amostras de água do P1 e P2 e o CN, ao passo em que foram corroborados esses efeitos nos testes com Trifluralina (Tabela 4).

As alterações mutagênicas são caracterizadas como modificações genéticas herdáveis, diferentes das alterações genotóxicas, que são danos que podem ser corrigidos pelo sistema de reparo celular. Dentre as alterações mutagênicas, destaca-se os eventos de micronucleação (teste do micronúcleo - MN) e as quebras cromossômicas (FISKEJÖ, 1985). Tanto pelo teste de aberrações cromossômicas, que avaliou presença de células com quebras cromossômicas, como pelo teste do MN, não foram evidenciados efeitos mutagênicos significativos, em relação ao CN, para as águas coletadas nos P1 e P2, ao passo em que ambos os controles positivos (MMS e Trifluralina) apresentaram esses efeitos.

A presença de MN pode acontecer devido a dois tipos de ação da substância tóxica ou de uma amostra ambiental, a ação aneugênica ou a clastogênica (PAVLICA et al., 2002). Os ensaios realizados com *A. cepa* permitem avaliar os dois tipos de ações (aneugênica e a clastogênica) que a célula pode sofrer, quando exposta a um agente mutagênico (SOUZA et al., 2014). A ação aneugênica é quando o agente tóxico interfere nas estruturas citoplasmáticas da célula, prejudicando, por exemplo, a polimerização dos fusos mitóticos, induzindo aneuploidia ou segregação cromossômica anormal, ocasionando aderências e perdas cromossômicas, C-metáfases e células multipolares, (FERNANDES et al., 2007), enquanto que o agente de ação clastogênica interfere diretamente no material genético, modificando a guanina para 7-metilguanina e a adenina para 3-metiladenina, causando, respectivamente, mau pareamento de bases e bloqueio da replicação (BERANEK, 1990), induzindo eventos de quebras cromossômicas (FENECH, 2000; LEME e MARIN-MORALES, 2009; SOUZA et al., 2014).

Quando a ação de alguma substância é muito severa para a célula, ela pode induzir à morte celular.

Muitos autores utilizam esse bioindicador para avaliar efeitos de agentes mutagênicos. Um dos estudos que reforça a aplicabilidade do teste para esse fim é o de Grover et al. (1990). O autor obteve um resultado de concordância de 91,5% entre as análises de efeitos genotóxicos observados em *A. cepa* com as de células de medula óssea em ratos, demonstrando a

similaridade da resposta entre esses grupos.

Embora os resultados de genotoxicidade dos pontos avaliados (P1e P2) não tenham sido significativos, em relação ao controle negativo, podemos inferir que esses pontos apresentam contaminantes que sugerem efeitos clastogênicos (Tabela 4), uma vez que foram observadas células aberrantes características de efeito clastogênico (similares às induzidas pelo CP - MMS) e células portadores de alterações derivadas de presença de agentes aneugênicos (semelhantes induzidas pela trifluralina). Esses resultados observados corroboram a confiabilidade dos testes realizados com *A. cepa*, para avaliação de toxicidade ambiental.

O processo de liberação do necrochorume, em condições isentas de umidade, acontece, de acordo com Castro (2008), até cerca de 2,5 anos pós morte, tempo este necessário para que todos os processos de decomposição ocorram. No caso dos corpos que se encontram por muitos anos em estado de saponificação, como os que foram sepultados em terrenos extremamente úmidos, não se sabe por quanto tempo ocorre a liberação de necrochorume. Se considerarmos a possibilidade de um corpo saponificado ir diminuindo a liberação de necrochorume na água que mantém a cova úmida, é possível inferir que, após alguns anos, o líquido presente na cova possa ser menos tóxico nas estações chuvosas, devido a possibilidade de haver uma maior diluição dos contaminantes. Caso o corpo esteja liberando necrochorume, esse líquido contém aminas biogênicas, como a cadaverina e a putrescina, que são moléculas que, em concentrações fisiológicas (na sua forma endógena), fazem parte da fisiologia celular, participando de diversos processos celulares, como crescimento e divisão celular, transcrição, tradução e processos de morte celular (HUSSAIN et al., 2011; SVENSSON, 2012), porém, se introduzidas de forma exógena e em altas concentrações, a tendência é que a divisão celular seja prejudicada, decorrendo assim em alterações celulares e cromossômicas (UNAL, PALAVAN-UNSAL e TUFEKCI, 2008).

O que ocasiona a saponificação dos corpos é a ação de enzimas bacterianas que promovem a mudança de ácidos graxos insaturados para saturados, os quais acabam por cristalizar e promovem a solidificação do tecido (FIEDLER e GRAW, 2003). Com isso, o tecido fica endurecido, mantendo a forma inicial do mesmo (FROENTJES 1965). Sendo assim, outro possível problema, além dos analisados nesse trabalho, é a presença dessas bactérias que atuam ativamente no processo de saponificação.

Em uma análise ambiental, é muito importante associar as análises toxicológicas com resultados de parâmetros microbiológicos, físicos e químicos. Assim, seria muito interessante ter essas análises para as águas coletadas no P1e P2, no o período chuvoso, pois, certamente, esses dados poderiam acrescentar informações que auxiliariam na interpretação dos resultados

da presentes pesquisa. Contudo, para que esse estudo possa ser ainda melhor elucidado, seria interessante realizar coletas de água nos mesmos pontos coletados (P1 e P2) em períodos mais secos, como o de estiagem no inverno, que acontece de junho a setembro.

O estudo aqui apresentado é inédito, quanto a avaliação dos possíveis potenciais tóxicos, citogenotóxicos e mutagênicos de ambientes de cemitérios. Portanto, é um estudo ainda preliminar, que mostra a necessidade de realização de mais investigações científicas nesta área, que possam auxiliar na resolução de problemas decorrentes de instalações inadequadas de cemitérios, principalmente em centros urbanos, bem como para auxiliar os órgãos governamentais na elaboração de diretrizes relacionadas com as características estruturais dos cemitérios, que possam minimizar os efeitos das contaminações oriundas da decomposição cadavérica. Só assim, haverá uma gestão melhor das necrópoles e, conseqüentemente menores impactos ambientais e menos riscos tanto para a biota associada a esses ambientes como para a saúde humana.

6. Conclusão

Ao ser avaliada a problemática da inundação em covas, a qual impede que os processos de decomposição cadavérica ocorram, mantendo o cadáver, muitas vezes permanentemente no processo de saponificação, tanto o P1 quanto o P2, mostraram que o efeito de saponificação persiste nestas covas, há mais de 12 anos, comprovando que os corpos continuam impactando tanto o solo como o próprio lençol freático do local.

Nas análises de germinação e de crescimento radicular e do hipocótilo, realizados com o bioindicador *L. sativa*, não foram encontrados efeitos fitotóxicos para as amostras de águas coletadas nas sepulturas dos pontos P1 e P2.

Pelas análises realizadas com as amostras de água coletadas nas covas (P1 e P2) do cemitério São João Batista (Leme-SP), com o bioindicador *A. cepa*, não foram registrados efeitos tóxicos, comprovados pelos resultados dos ensaios de germinação com sementes deste bioindicador; citotóxicos, por meio dos testes de índice mitótico e de morte celular; nem mutagênicos, pelo teste do micronúcleo.

Os resultados negativos de toxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade podem estar associados com a alta diluição dos poluentes, uma vez que as coletas foram realizadas em um período de altos índices pluviométricos. Desta forma, outros estudos também devem ser realizados, nas mesmas covas, mas em períodos mais secos.

Os resultados toxicológicos obtidos no estudo, mostram também a necessidade de

associar esses dados com análises químicas e microbiológicas, tanto do P1 quanto do P2, para esse período chuvosa.

Pelos resultados do estudo, entendemos que também seria importante um monitoramento contínuo de águas que inundam as sepulturas do cemitério São João Batista, tanto em período chuvoso como seco, desde o momento do sepultamento até que haja a isenção total da toxicidade. Esse estudo mais amplo poderia trazer informações importantes para melhor estimar os reais impactos ambientais e as consequências à saúde, decorrentes de processos persistentes da etapa de saponificação.

Os dados apresentados neste estudo são inéditos e podem auxiliar em diretrizes que definem as exigências mais efetivas para instalação de novos cemitérios, bem como para a melhor manutenção de necrópoles já implantadas.

7. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, A.M. de; Parâmetros físico-químicos de caracterização de contaminação do lençol freático por necrochorume. **Seminário de Gestão Ambiental - Um convite a interdisciplinariedade**, 2005.
- ANJOS, R.M. dos. Cemitérios: uma ameaça à saúde humana. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. 2007. p. 02-07.
- ANTONIO, A.S.; DE PAULA, A.R.U.; AGUIAR, A.T.C, da COSTA, L.C.A; KEPLER, ATEEQ, B.; FARAH, M.A.; Ali, M.N.; AHMAD, A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. **Mutat. Res.** 514, 105–113, 2002.
- ARAGÃO, F.B., ANDRADE-VIEIRA, L.F., FERREIRA, A., COSTA, A.V., QUEIROZ, V.T., PINHEIRO, P.F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa* L. Allelopathy J. Lavras, v.35, n.2, p. 259-272, 2015.
- ATEEQ, B.; FARAH, M.A.; Ali, M.N.; AHMAD, A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. **Mutat. Res.** 514, 105–113, 2002.
- BACIGALUPO, R. Cemitérios: fontes potenciais de impactos ambientais. História **Natureza e Espaço- Revista eletrônica**, v. 1 (1): 1, 1- 8 p., 2012. Disponível em: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/niesbf/article/view/4461/3264>. Acesso em: 16/12/2020.
- BERANEK, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research*, v. 231, p. 11–30, 1990.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- 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*, 74: 826-833, 2011.
- 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.
- BOCCHESE, M. G. Avaliação para a adequação jurídico-ambiental de um cemitério em área urbana. **Acta Ambiental Catarinense**v.9, 2012.
- CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G.; MARURI, A. B. Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 201-206, 1999.
- CAMPOS, A. P. S. Avaliação do potencial de poluição no solo e nas águas subterrâneas decorrentes da atividade cemitério. São Paulo: [s.n.], 2007.
- 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**, 72(5), 722–725, 2008.

CASTROL, D.L. Caracterização geofísica e hidrogeológica do cemitério bom jardim, fortaleza – CE. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 26, p. 251-271, 2008

CHARLES, J., et al. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74, 2057–2064, 2011.

CHAUHAN, L.K.S., SAXENA, P.M., GUPTA, S.K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environ. Exp. Bot.** 42, 181–189, 1999.

CONSTANTIN, M. J.; OWENS, E. T. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays a report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, 99(1), 1–12, 1982.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento** 3: 24-26, 2000.

DA COSTA SILVA, R. W.; MALAGUTTI FILHO, W.. Geoelectrical mapping of contamination in the cemeteries: the case study in Piracicaba, São Paulo/Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 66, n. 5, p. 1371-1383, 2012.

DENT, B.B.; Review of human decomposition in soil. **Environmental Geology**. 45, p.576–585, 2004.

DEUBER, R. Botânica das plantas daninhas. **Ciência das Plantas Daninhas (Deuber R, ed.). FUNEP, Jaboticabal**, p. 31-73, 1992.

DIX, J.; GRAHAM, M. Time of death, decomposition and identification: an atlas. **CRC, Boca Raton, Fla**, 2000.

EL-SHAHABY, O. A. et al. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 23-28, 2003.

EVANS, W.E. Adipocere formation in a relatively dry environment. **Med Sci Law** 3:145–153, 1963.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

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.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent –Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009.

FIEDLER, S. et al. Graveyards—special landfills. **Science of the Total Environment**, v.

419, p. 90-97, 2012.

FIEDLER, S.; GRAW, M. Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere. **Naturwissenschaften**, 2003.

FIEDLER, S.; WEINZIERL W.; WALDMANN F.; GRAW M. Problems of decomposition in cemetery soils: Evaluation of 'Baden-Wrttemberg. Z. **Dtsch. Geol. Ges.**, 2003.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.

FLEIGE, H.; HORN R.; BLUME H-P.; WETZEL H. Bodenkund liches Bewertungsver fahrenzur Bestimmung des Eignungs grades von Friedhfen. **Wasser Boden** 54:31–39, 2002.

FREITAS, A.S., CUNHA, I.M.F., ANDRADE-VIEIRA, L.F., TECHIO, V.H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicol. Environ. Saf. Lavras**, v.124, p. 426-434, 2016.

FROENTJES, W. Kurzer Bericht über die unvollständige Leichenzersetzung auf Friedhöfen und die Adipocirebildung. **Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med**, v. 56, p. 205-207, 1965.

GOPALAN, H.N.B. Ecosystem health and human wellbeing: the mission of the international programme plant bioassays. **Mutat. Res.** 426, 99–102, 1999.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in Allium: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

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.** 426: 107–112, 1999

GROVER, I. S. et al. Genotoxicity of pesticides and plant systems. **Progress in clinical and biological research**, v. 340, p. 91-106, 1990.

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

HOLLAND, K. Stadtbden im Keuperland am Beispiel Stuttgarts. **Hohenheimer Bodenkund liche Hefte** 39, 1996.

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.

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., Geneva, Switzerland (ISSO 11269-2), 1995.

- KEMERICH, P. D. C.. et al. Valores anômalos de metais pesados em solo de cemitério. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 7, n. 1, p. 140-156, 2012.
- KILLAM, E. The detection of human remains. **CC Thomas, Springfield, Ill**, 1990.
- 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. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** 650, 80–86, 2008.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.
- LOPES, P. R. M. Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI. 2014. 183 f. Tese - (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2014.
- LYU, J. et al. Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 149, p. 225-232, 2018.
- MA, T.H. The international program on plant bioassays and thereport of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutat. Res.*, 103–106, 1999.
- MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia** 69, 399–408, 2004.
- 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.; 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.
- 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**, v. 9, n. 2, p. 216-230, 2017.
- NEWMAN, M. C. **Fundamentals of ecotoxicology**. CRC press, 2009.
- NEWMAN, M.C., UNGER, M.A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2. Ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002.
- OLIVEIRA, B. et al. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. **Water and environment journal**, v. 27, n. 1, p. 99-106, 2013.
- PACHECO, A.; **Meio ambiente e cemitérios**. São Paulo: Editora Senac, 2012.
- PACHECO, A; MATOS, B.A. Cemitérios e meio ambiente. *Tecnologia do ambiente*, 33 (7):

13-15, 2000.

PALMIERI, M.J. et al. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research** 763; 30–35, 2014.

PAVLICA, M. et al. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 43, n. 3, p. 0284-0291, 2002.

PRIAC, A.; BADOT, P.; CRINI, G.. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188-194, 2017.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, v.18, 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.

SILVA, R. W. C.; MALAGUTTI FILHO, W. O emprego de métodos geofísicos na fase de investigação confirmatória em cemitérios contaminados. **EngSanitAmbient** v.14 n.3 327-336, 2009.

SILVA, V. T. da. Um Olhar Sobre as Necrópoles e seus Impactos Ambientais. III Encontro da ANPPAS, 2006.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: G. Castillo (ed.) **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. Canadá: IDRC/IMTA. p. 71-79, 2004.

SOUZA, P. M. S. Estudo da influência de argilas organofílicas no processo de biodegradação do PLA. **Polímeros**, v. 24, n. 1, p. 110-116, 2014.

Svensson, K, 2012. Mechanistic studies on the role of polyamines and microvesicles in tumor growth and hypoxia-mediated angiogenesis.
<https://lup.lub.lu.se/search/ws/files/4071587/2294184.pdf> (accessed 21.12.2020).

THOMAS, J. M. et al. Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 5, n. 5, p. 487-501, 1986.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 1, p. 151-173, 1977.

TIGRE, R.C.; SILVA, N.H.; SANTOS, M.G.; HONDA, N.K.; FALCÃO, E.P.S.; PEREIRA, E.C. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.84, p. 125-132, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.06.026>>.

TURKOGLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate

and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology** 46: 2035–2041, 2008.

UCISIK, A. S. et al. **The impact of cemeteries on the environment and public health: an introductory briefing**. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 1998.

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

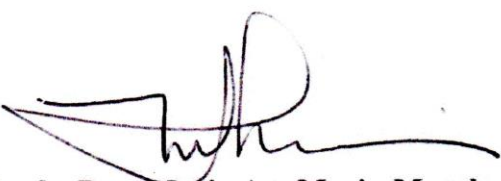
VALERIO, M.E.; Garcia, J.F.; PEINADO, F.M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Sci. Total Environ.** 378, 63–66, 2007.

VASS, A. A.; Beyond the grave – understanding human decomposition. **Microbiology today** vol. 28, 2001.

WANG, W. Literature review on higher plants for toxicity testing. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 59, n. 3-4, p. 381-400, 1991.

WELL, E.J. et al. The assessment of adipocere to estimate the post-mortem interval – a skeleton from the tidelands. **Anthropol. Anz.** 73/3 235–247, 2016.

ŻYCHOWSKI, 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.



Prof. Dra. Maria Ap. Marin Morales
Orientadora



Gabriel Bertoletti Barozzi
Aluno



Ms. Letícia Rocha Gonçalves
Co-orientadora