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

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

CITOGENOTOXICIDADE DE SOLO CONTAMINADO POR NECROCHORUME E TOXICIDADE DE AMINAS BIOGÊNICAS DERIVADAS DE PROCESSOS PUTREFATIVOS

LETÍCIA ROSA DE SOUZA

Rio Claro/ SP
2021

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

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

CITOGENOTOXICIDADE DE SOLO CONTAMINADO POR NECROCHORUME E TOXICIDADE DE AMINAS BIOGÊNICAS DERIVADAS DE PROCESSOS PUTREFATIVOS

LETÍCIA ROSA DE SOUZA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

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

Rio Claro/ SP
2021

S729c

Souza, Letícia Rosa de

Citogenotoxicidade de solo contaminado por necrochorume e toxicidade de aminas biogênicas derivadas de processos putrefativos / Letícia Rosa de Souza. -- Rio Claro, 2021

123 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Aparecida Marin-Morales

1. Impactos de cemitérios. 2. Simulação de inumação. 3. Contaminação de solo. 4. Ensaios ecotoxicológicos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CITOGENOTOXICIDADE DE SOLO CONTAMINADO POR NECROCHORUME E TOXICIDADE DE AMINAS BIOGÊNICAS DERIVADAS DE PROCESSOS PUTREFATIVOS

AUTORA: LETICIA ROSA DE SOUZA

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Profa. Dra. LAÍS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO (Participação Virtual)

Prof. Dr. FLAVIO MANOEL RODRIGUES DA SILVA JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Rio Grande

Rio Claro, 04 de outubro de 2021

Dedico este trabalho aos meus pais, Lúcia e Lázaro e ao meu amado irmão, Tiago.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, Lúcia, Lázaro e Tiago, por todo apoio, carinho e amor em todos os momentos durante a realização deste trabalho. Vocês sempre serão a minha maior fonte de inspiração e de força. É tanto amor que não cabe no peito.

À professora Marin, por todos os ensinamentos, conselhos e extrema dedicação. Muito obrigada por me acolher e me permitir fazer parte do seu grupo; por cada palavra amiga durante os momentos difíceis e por não medir esforços para que o grupo continuasse unido e motivado diante deste período tão delicado que estamos enfrentando.

À minha irmã de alma, Ana Paula, que segue presente em minha vida há mais de uma década. Muito obrigada por sempre me incentivar, por enxergar o melhor em mim; obrigada pelas sábias palavras, pelos cafés filosóficos, pelos abraços, risos de perder o fôlego e por estar presente em mais um momento tão importante da minha vida. Te amo muito, minha amiga.

À minha madrinha Ma e prima/ amiga Vanessa, muito obrigada por cada conversa, conselho e apoio nos momentos difíceis. Vocês são muito importantes pra mim.

Obrigada também às "Girls", Ana Cristina, Maraia (Maria Gabriela) e Mari por compartilharem de perto essa jornada, seja durante os experimentos, durante as minhas coletas "cheirosas" (Necrochoruuuume), durante os "dedos de prosa" nos cafezinhos, cantorias, troca de água dos peixes (saudades, Ariel) e por todo suporte. Sem dúvida vocês tornaram esse momento mais leve e especial.

Aos mutagênicos e companheiros de laboratório, Kemmy, Giovanna, Gaby, Rodrigo, Gabriel, Lê Rocha, Lais, Matheus Gonçalves, Letícia Gigeck, Letícia Gonçalves, Jaquelaine, Nádia, e Cleiton, muito obrigada por toda ajuda, conselhos, risadas e por cada contribuição durante a realização desse projeto.

À nossa querida técnica, Adriana, por sempre cuidar tão bem do nosso ambiente de trabalho; por toda ajuda e ensinamentos que foram essenciais para conclusão deste trabalho. Muito obrigada por tudo, Dri.

Aos professores e funcionários do Depertamento de Biologia Geral e Aplicada, pela ajuda, suporte e bons momentos.

Ao Instituto de Biociências de UNESP de Rio Claro e ao Labratório de Mutagênese Ambiental (LMA) por oferecer toda a infraestrutura necessária para a realização deste projeto de mestrado.

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

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste projeto, meus sinceros agradecimentos!

"A ausência de evidência não é evidência de ausência."

- Carl Sagan

RESUMO

O ritmo acelerado do crescimento demográfico vem contribuindo para para o aumento dos níveis de poluição ambiental. Uma das atividades humanas que vem se destacando como muito poluidora é a prática de sepultamento em cemitérios. Embora o ato de enterrar os corpos seja quase tão antigo quanto a própria humanidade, só recentemente os cemitérios têm sido considerados e discutidos como importantes fontes poluidoras. Apesar de existirem leis ambientais que regem a instalação e o funcionamento das necrópolis, esses ambientes continuam sendo grandes centros de contaminação química e biológica, com destaque aos compostos orgânicos, como as aminas biogênicas cadaverina ($C_5H_{14}N_2$) e putrescina ($C_4H_{12}N_2$). Essas aminas são encontradas naturalmente nas células, porém, quando elas estão presentes no meio ambiente em altas concentrações podem levar a problemas ambientais e também à saúde humana. O porco doméstico (*Sus scrofa domesticus* L.) é considerado um modelo animal com características de cadaverização semelhantes às humanas, por isso muito utilizado em experimentos que envolvem o processo de decomposição cadavérica. O solo desempenha um papel muito importante na filtragem de metais, micro-organismos e substâncias resultantes do processo de decomposição biológica, porém ainda existem poucos estudos que abordem os poluentes inerentes às atividades de decomposição cadavérica, comum em ambientes de cemitérios. Neste mesmo contexto, ainda são escassos os estudos sobre a real ação desses poluentes sob o meio biológico. Desta forma, pelo aumento constante das atividades cemiteriais e pela lacuna de informações sobre os efeitos de seus poluentes, existe uma necessidade urgente de se desenvolver estudos que possam melhor esclarecer os possíveis impactos, tanto ao ambiente como à saúde humana, das práticas de inumação dos corpos. O presente estudo realizou uma ampla revisão sobre aminas biogênicas associadas a processos putrefativos, que permitiu a elaboração de um artigo. Este trabalho também simulou uma contaminação de cemítério, por meio de inumação de uma carcaça suína, e avaliou os efeitos biológicos dos contaminantes derivados da decomposição cadavérica. A fitotoxicidade foi avaliada pelo índice de germinação de sementes e mensuração do eixo hipocótilo-radicular de *Lactuca sativa.* Os testes de citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico foram realizados pelos parâmetreos de Índice Mitótico (IM), indução de Aberrações Cromossômicas (AC) e de Micronúcleo (MN), respectivamente, com a espécie *Allium cepa*, além de uma revisão das informações sobre a toxicidade de aminas biogênicas derivadas de processos putrefativos. Os

nossos resultados mostraram que, os componentes do necrochorume interferiram no desenvolvimento das raízes e do hipocótilo e induziram aberrações cromossômicas e nucleares nos bioindicadores vegetais utilizados neste estudo. As informações obtidas nesse estudo podem dar um maior suporte aos órgãos competentes para elaboração de leis, além de alertar para as possíveis consequências dos impactos ambientais da atividade cemiterial e suas consequências para a saúde humana.

Palavras-chave: *Allium cepa*; cadaverina; impacto de cemitérios; *Lactuca sativa;* putrescina; *Sus scrofa domesticus.*

ABSTRACT

Demographic growth has contributed to the increase in levels of environmental pollution. One of the human activities that has been highlighted as very polluting is the practice of burial in cemeteries. Although the act of burying bodies is almost as old as humanity itself, only recently have cemeteries been considered and discussed as important sources of pollution. Despite the existence of environmental laws that govern the installation and operation of necropolises, these environments continue to be major centers of chemical and biological contamination, with emphasis on organic compounds, such as biogenic amines cadaverine ($C_5H_{14}N_2$) and putrescine ($C_4H_{12}N_2$). These amines are found naturally in cells, however, when they are present in the environment in high concentrations they can lead to environmental problems as well as human health. The domestic pig (*Sus scrofa domesticus* L.) is considered an animal model with cadaverization characteristics similar to those of humans, which is why it is widely used in experiments involving the process of cadaveric decomposition. Soil plays a very important role in filtering metals, microorganisms and substances resulting from the biological decomposition process, but there are still few studies that address the pollutants inherent in cadaveric decomposition activities, common in cemetery environments. In this same context, studies on the real action of these pollutants in the biological environment are still scarce. Thus, due to the constant increase in cemetery activities and the lack of information about the effects of its pollutants, there is an urgent need to develop studies that can better clarify the possible impacts, both on the environment and on human health. This study carried out a comprehensive review about biogenic amines associated with putrefactive processes, which allowed the elaboration of an article. This work also simulated a cemetery contamination, through burial of a swine carcass, and evaluated the biological effects of contaminants derived from cadaveric decomposition. Phytotoxicity was evaluated by seed germination index and measurement of the hypocotyl and root of *Lactuca sativa*. Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenic potential tests were performed using the parameters of Mitotic Index (MI), Chromosome Aberrations (CA) and Micronucleus (MN), respectively, with the species *Allium cepa*, in addition to a review of information about the toxicity of biogenic amines derived from putrefactive processes. Our results showed that the components of cemetery leachate interfered with the development of roots and hypocotyl and induced chromosomal aberrations and nuclear alterations in plant bioindicators used in this study. The information obtained in this study can give greater support to Organs competent

bodies for drafting laws, in addition to alerting to the possible consequences of the environmental impacts of cemetery activity and its consequences for human health.

Keywords: *Allium cepa*; cadaverine; impact of cemeteries; *Lactuca sativa*; putrescine; *Sus scrofa domesticus.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Local do experimento

Figura 2 Extratos aquosos obtidos após o período de decantação

Figura 3 Obtenção da capacidade máxima de retenção de água

Figura 4 Esquema de formação de aminas biogênicas a partir de seus aminoácidos precursores

Figura 5 Resultados dos bioensaios de germinação realizados com *Lactuca sativa*

Figura 6 Resultado do bioensaio de crescimento de radícula e hipocótilo em *L. sativa*

Figura 7 Evidência da presença de necrochorume no solo

Figura 8 Resultado do bioensaio de citotoxicidade em *Allium cepa*

Figura 9 Frequência de Aberrações cromossômicas e nucleares em sementes de *Allium cepa*

Figura 10 Aberrações cromossômicas e nucleares observadas nos ensaios de genotoxicidade e potencial mutagênico em células meristemáticas de *Allium cepa*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Média diária da precipitação do período de coleta do experimento de inumação da carcaça suína

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Informações gerias sobre as aminas biogênicas

Quadro 2 Fases da putrefação e suas características

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Aminas Biogênicas
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	Aberrações Cromossômicas
NA	Aberrações Nucleares
AGM	Agmatina
CA	Controle Ambiental
CAD	Cadaverina
CDI	Cadaver Decomposition Island
Cm	Centímetro
CN	Controle Negativo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Controle Positivo
DAO	Diamina oxidase
EFSA	European Food Safety Authority
EPD	Espermidina
EPM	Espermina
FDA	Food and Drug Asministration
FEA	Feniletilamina
HIS	Histamina
HNMT	Histamina N-metiltransferase
IARC	International Agency for Research on Cancer
IM	Índice Mitótico
IPM	Intervalo post-mortem
ISO	International Organization for Standardization
kg	Quilograma
L	Litro
MAO	Monoamina oxidase
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro

MN	Micronúcleo
NBR	Norma Brasileira
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
pH	Potencial hidrogeniônico
PUT	Putrescina
TIR	Tiramina
TRI	Triptamina
TRIF	Trifluralina
UNEP	United Nations Environment Program
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WHC	Water Holding Capacity
WHO	World Health Organization
$ZnSO_4 7H_2O$	Sulfato de zinco heptahidratado
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 OBJETIVOS 20
2.1 Objetivo geral 20
2.2 Objetivos específicos 20
3 REVISÃO DE LITERATURA 21
3.1 Contaminação ambiental de cemitérios 21
3.2 Processo de decomposição de corpos humanos 23
3.3 Necrochorume 25
3.4 Aminas biogênicas: cadaverina e putrescina 25
3.5 Utilização do porco doméstico como modelo animal 26
3.6 Bioindicadores vegetais 27
3.6.1 *Allium cepa* 27
3.6.2 *Lactuca sativa* 28
4 MATERIAIS E MÉTODOS 29
4.1 Experimento de inumação 29
4.2 Cálculo do peso seco 31
4.3 Obtenção do extrato aquoso (ABNT, 2004 – Norma NBR 10.006) 31
4.4 Capacidade de retenção de água do solo (WHC) (ABNT NBR ISO 11269 - 2:2014) 32
4.5 Ensaio com o organismo teste *Allium cepa* 33
4.6 Teste de Aberrações Cromossômicas e de Micronúcleos em células meristemáticas 34
4.7 Análise dos resultados 35
4.8 Teste de germinação e alongamento radicular e de hipocótilo em *Lactuca sativa* 33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 103
7 REFERÊNCIAS 104

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional desenfreado tem gerado sérios problemas ambientais e, por isso, vem sendo caracterizado um grande desafio a ser vencido neste século. Os resíduos químicos derivados de ações antrópicas podem agredir o ecossistema e causar danos à biota endêmica e à saúde humana. Por este motivo, existe hoje uma grande preocupação em se conhecer os possíveis efeitos biológicos dos xenobióticos, o que tem levado a necessidade de realização estudos que avaliem, de forma efetiva, a toxicidade e citogenotoxicidade desses agentes para o meio biológico (LEME; MARIN-MORALES, 2009; HOORNWEG; BHADA-TATA; KENNEDY, 2013; YANG et al., 2017).

Dentre as fontes urbanas de poluição, destacam-se resíduos gerados pelos tratamentos de águas residuárias e de água de abastecimento (e.g. efluentes líquidos lançados em corpos d'água e resíduos semi-sólidos, como os lodos, dispostos em aterros especiais), bem como os resíduos sólidos dispostos em aterros sanitários. Recentemente, os ambientes de cemitérios têm sido incluídos nessas fontes de contaminação antrópica, por contaminarem o ambiente com resíduos físicos e químicos, originados durante o processo de putrefação cadavérica, e por disponibilizarem no ambiente uma alta carga de contaminantes biológicos, advindos dos corpos sepultados (JONKE; OLIVIER, 2012; NECKEL et al., 2017).

As preocupações com a saúde pública, decorrentes de questões sanitárias e ambientais relacionadas à atividade cemiterial, ganharam força no século XIX, quando o crescimento exponencial da população influenciou, diretamente, no aumento da demanda por novos cemitérios. Muitas vezes, as necrópolis são inadequadamente instaladas, e isso acontece principalmente por falta de planejamento ou falha na fiscalização pelos órgãos ambientais competentes. Além disso, devido ao alto e constante crescimento urbano, muitas necrópoles, originalmente instaladas distantes de áreas habitáveis, encontram-se hoje localizadas muito próximas das cidades, o que vem colocando em risco a saúde da população do seu entorno (ROMANÓ, 2010; OLIVEIRA et al., 2013; QUINTON et al., 2020). Como as atividades tafonômicas podem se caracterizar como uma fonte de poluição e de incômodo social, elas requerem estudos que antecipem as suas consequências (WITT; CASSELLA, 2015; HART; AINSWORTH; WILLIAMS, 2017; VARLET et al., 2020). Embora os estudos de decomposição constituam cópias de eventos naturais que ocorrem no ambiente, a dimensão das atividades humanas neste setor leva a uma necessidade de se considerar vários aspectos

importantes, como o impacto da qualidade do ar (odor); os contaminantes biológicos e químicos; os possíveis comprometimentos nas águas subterrâneas e superficiais, impactos ecológicos para a fauna, flora e a saúde humana; impactos geológicos; bem como a preservação de patrimônio arqueológico e cultural (VARLET et al., 2020).

No Brasil, os cemitérios são considerados fontes de contaminação ambiental de acordo com a Resolução n° 335/2003 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2003). O principal impacto causado pelas necrópoles é a liberação intermitente de um líquido, denominado necrochorume, derivado do processo de decomposição dos corpos. Em sua composição, estão presentes substâncias orgânicas com potencial tóxico, dentre elas as aminas biogênicas, cadaverina ($C_5H_{14}N_2$) e putrescina ($C_4H_{12}N_2$) (DENT; KNIGHT 1995; SILVA, 1998; CAŁKOSIŃSKI et al., 2015). Sabe-se que a contaminação por substâncias tóxicas formadas em cemitérios ocorre de forma sutil, mas constante, com possibilidade de disseminação para outros compartimentos ambientes interassociados (KEMERICH et al., 2014a; AMORIM; CRUZ, 2014).

O conhecimento atual sobre o processo de decomposição de corpos está muito associado a experimentos realizados com cadáveres não humanos, como carcaças de porcos, cujos estudos têm contribuído, significativamente, para um melhor conhecimento desta área de estudo (MATUSZEWSKI et al., 2020). O porco doméstico (*Sus scrofa domesticus* L.) é considerado um excelente modelo animal para estudos de cadaverização, por ser a espécie que mais se assemelha às características de decomposição dos seres humanos. Isso se deve à sua semelhança na dieta (onívora), de flora intestinal e a constituição dérmica desses dois organismos (CATTS; GOFF, 1992; CAMPOBASSO et al., 2001; CRUZ; VASCONCELOS, 2006; KEOUGH; MYBURGH; STEYN, 2016; SZELECZ et al., 2018).

De acordo com Caritá e Marin-Morales (2008), para melhor identificar os reais efeitos dos xenobiontes sobre o meio biológico, devem ser aplicados diferentes bioensaios, em diferentes condições de exposições (concentrações, tempos de exposição, características químicas do produto além de dados fisisicos como temperatura, pH, dentre outros). Os testes de toxicidade são muito utilizados em avaliações da qualidade ambiental e representam uma importante ferramenta para diagnosticar os possíveis imapactos que as substâncias tóxicas possam promover no meio biológico e à saúde humana, já que as análises químicas descrevem apenas o tipo de agente envolvido na contaminação (PANDARD et al., 2006; WILKE et al., 2008; CESAR et al., 2014).

As plantas possuem capacidade de metabolizar muitos compostos tóxicos, principalmente por sistemas enzimáticos que ativam os promutágenos por processos de monooxigenação, peroxidação e conjugação (STIBOROVA; ANZENBACHER, 1991). Apesar de haver diferenças entre as atividades metabólicas de vegetais e mamíferos, a ativação pró-mutagênica dos vegetais superiores pode contribuir como um pré-diagnóstico de avaliação de possíveis efeitos de xenobiontes sobre os mamíferos, o que acaba sendo de grande relevância na interpretação da ação de diferentes agentes químicos sobre a espécie humana (FISKEJÖ, 1985).

Diversas espécies de plantas são utilizadas como indicadores de citogenotoxicidade e mutagenicidade ambiental (MALUSZYNSKA; JUCHIMIUK, 2005; LEME; MARIN-MORALES, 2009, TIMOTHY et al., 2014), destacando-se entre elas os modelos vegetais *Allium cepa* e *Lactuca sativa* (LEME; MARIN-MORALES, 2009; TIGRE et al., 2012, SILVEIRA et al., 2017).

A espécie *A. cepa* apresenta características biológicas interessantes que fazem dessa espécie um bioindicador robusto e amplamente utilizado em avaliações de toxicidade de contaminantes ambientais. Dentre as vantagens de seu uso, destacam-se a presença de cromossomos grandes e em número reduzido (2n=16), o baixo custo dos ensaios, fácil manuseio e uma excelente correlação com osutros sistema biológicos, como animais e plantas (GRANT, 1982; LEME, MARIN-MORALES, 2009; FIRBAS; AMON, 2013), sendo utilizado como um organismo padrão para testes rápidos (SMAKA-KINCL et al., 1996). Os bionsaios com *A. cepa* também são amplamente utilizados em investigação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de xenobióticos (FERNANDES et al., 2009), sendo indicado para avaliação de efeitos clastogênicos e aneugênicos sobre o material genético (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; BAGATINI; SILVA; TEDSESCO, 2007; GRIPPA et al., 2010; TESHIKA et al, 2019). Estudos realizados por Fiskejö (1981, 1985) levaram o autor a considerar que os efeitos observados em *A. cepa* podem ser uma indicação de que o químico testado pode também causar danos em outros organismos.

O bioindicador *L. sativa* é classificado como um modelo para estudos macroscópicos, sendo um excelente bioindicador de fitotoxicidade. Com este teste, é possível avaliar as influências de xenobiontes sobre a taxa de germinação de sementes e a potencialidade do químico inibir o crescimento radicular (EOM et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; ARAGÃO et al., 2015; PARK et al., 2016). Alguns autores indicam que o crescimento radicular pode ser

afetado por diversas condições ambientais, como diferenças de pH, temperatura, salinidade e presença de metais (CAMARGO et al. 2004; FUENTES et al., 2004).

Os impactos ambientais de cemitérios, causados por necrochorume, ainda é um assunto bastante recente e pouco discutido pela comunidade científica. Neste contexto, o presente estudo avaliou a citogenotoxicidade de amostras de solo contaminados com necrochorume, por meio de ensaios com os bioindicadores *A. cepa* e *L. sativa*. Os dados desta avaliação podem auxiliar nas tomadas de decisão dos órgãos ambientais competentes, quanto à implantação de medidas mitigadoras a serem aplicadas em ambientes de cemitérios.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial tóxico e citogenotóxico de amostras de solos obtidas por simulação de inumação de carcaça suína, por meio de ensaios com os sistemas *in vivo A. cepa* e *L. sativa*. Adicionalmente, também objetivou revisar e levantar informações sobre aminas biogênicas envolvidas em processos putrefativos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Monitorar o processo de decomposição cadavérica de uma carcaça suína inumada por meio de ensaios biológicos com vegetais superiores;
- ✓ Avaliar o efeito fitotóxico das amostras de solos contaminados e seus extratos aquosos, por meio do teste de germinação e alongamento do hipocótilo e da radícula de *L. sativa*;
- ✓ Avaliar o potencial tóxico, citogenotóxico e mutagênico de amostras de solos seus extratos aquosos contaminados com necrochorume, por meio do bioensaio com *A. cepa*;
- ✓ Levantar informações por meio da revisão de estudos sobre as aminas biogênicas, principais compostos relacionados ao processo putrefativo de alimentos e de cadáveres;
- ✓ Contribuir para o melhor entendimento do modo de ação do necrochorume em diferentes organismos teste vegetais;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Contaminação ambiental de cemitérios

O sepultamento de corpos é um ritual realizado desde a Idade Média. Esta prática se deu inicialmente pela disposição dos cadáveres nas igrejas e adjacências, portanto próximos das áreas habitáveis, o que resultou em problemas de saúde coletiva, como as epidemias de tifo e peste bubônica. Em decorrência disso, para presevar a qualidade de vida dos centros urbanos, foram criandos ambientes específicos para esse fim (cemitérios), que se localizavam distantes das cidades (PACHECO, 2000; LELI et al., 2012). Contudo, no Brasil, a proibição de sepultamentos em áreas urbanas só foi regulamentada em 1828, responsabilizando os municípios pelas questões sanitárias advindas dessas atividades (DUARTE, 2009; BORN; OLIVEIRA; CUBAS, 2014). No entanto, o intenso avanço da urbanização e crescimento populacional reintegraram os cemitérios à malha urbana e, consequentemente, o seu potencial risco de contaminação física, química e biológica, voltando a se caracterizando com um problema global de saúde pública (SILVA; MALAGUTTI FILHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2012, SANTOS; MORAES; NASCIMENTO, 2015; NECKEL et al., 2016, 2017, 2020).

Do ponto de vista científico, há um desconhecimento por parte da população sobre os impactos ambientais gerados pela decomposição de cadáveres em cemitérios. Contudo, foi a partir da proibição de sepultamentos em áreas urbanas que se iniciaram pesquisas abordando o processo de cadaverização de corpos humanos e, consequentemente, o conhecimento sobre a ação de enzimas microbianas responsáveis pela decomposição dos tecidos e produção de gases, líquidos e sais, estudos esses que vêm sendo ainda hoje aprofundados (BORN; OLIVEIRA; CUBAS, 2014; PINHEIRO, 2018).

Diante da diversidade e potencialidade tóxica das substâncias derivadas do processo de decomposição, é muito importante que, ao escolher um local para a instalação de um cemitério, seja realizada uma ampla avaliação das características geológicas e hidrogeológicas desse ambiente (SILVA; MALAGUTTI FILHO, 2008), pois deve-se evitar terrenos que facilitem a percolação ou o escoamento dos exudados cadavéricos. Üçisik e Rushbrook (1998) ressaltam a importância desse tipo de estudos, pois, de acordo com esses autores, o solo se comporta como filtro na retenção de metais, micro-organismos e demais substâncias oriundas do processo de decomposição. Dentre estas substâncias produzidas durante o processo de decomposição cadavérica, está o necrochorume que é liberado de forma intermitente e

apresenta um grau variado de patogenicidade e toxicidade (MIGLIORINI, 1994; KEMERICH et al., 2012). Desta forma, se a decomposição cadavérica ocorrer em locais que não foram criteriosamente avaliados quanto à geologia do terreno e à adequação da infraestrutura do impreendimento, pode-se correr o risco de haver significativos impactos tanto físicos quanto químicos do ambiente, decorrendo, sobretudo, em contaminação do solo e de águas superficiais e subterrâneas (ALCÂNTARA, 2010; SILVA; MALAGUTTI, 2010; BACIGALUPO, 2012).

Estudos realizados por Silva (2000) em 600 cemitérios brasileiros mostraram que 75% dos casos de contaminação em ambientes cemiteriais se davam em cemitérios municipais e 25% em cemitérios particulares, devido a problemas tanto de localização como operacionais, sendo, inclusive, alguns deles clandestinos. Albuquerque, Cerqueira e Albuquerque (2017) constataram que o cemitério de Queimadas/PB apresentava risco de contaminação por escoamento de necrochorume para águas superficiais. Neira et al. (2008) realizaram análises físico-químicas e bacteriológicas em águas subterrâneas do cemitério de Santa Inês (Vila Velha/ES). Os autores detectaram índices de compostos nitrogenados e microbiológicos elevados na água estudada. Em uma pesquisa realizada em Rondônia, Lozano et al. (2012) avaliaram a interferência de um cemitério sobre a qualidade da água de poços utilizados para consumo doméstico. Os autores observaram um aumento significativo de nitrato nas amostras de água dos poços contíguos ao cemitério. Em um estudo realizado por Kemerich et al. (2014a), foram identificadas alterações nas propriedades químicas do solo de um cemitério do Rio Grande do Sul. Os resultados mostraram alteração no pH do solo e aumento das concentrações de amônia, nitrato e nitrito, proporcional à profundidade avaliada.

Conforme descrito por Amuno (2013) e Silva (2020), grande parte dos cemitérios existentes hoje foram implantados sem qualquer precaução com possíveis impactos ambientais. Por esta razão, mesmo sendo esses ambientes considerados importantes fontes de contaminação, ainda existem poucos estudos que incluam esses locais como fontes poluidoras do solo e de águas superficiais e subterrâneas. Entretanto, sabe-se que a contaminação pelas substâncias tóxicas derivadas dos processos de decomposição cadavérica dos cemitérios ocorre de forma sutil, porém constante e com possibilidade de disseminação para outros ambientes do seu entorno (AMORIM e CRUZ, 2014; KEMERICH et al, 2014b).

Diante desta problemática, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu em 2003 a Resolução nº 335, que dispõe sobre o licenciamento ambiental de

cemitérios. Além de estabelecer critérios para sua implantação, a resolução também definiu um prazo para regulamentação deste tipo de empreendimento. A Resolução 335 e suas respectivas alterações (Resolução CONAMA nº 368/06 e Resolução CONAMA nº 402/08) determinam, para cemitérios horizontais, exigências quanto ao distanciamento do nível inferior da sepultura e o lençol freático; técnicas e práticas que permitam a troca gasosa; localização da área de sepultamento; caracterização do subsolo; e critérios para cemitérios instalados em áreas de mananciais usadas para abastecimento público (BRASIL, 2003; 2006; 2008).

3.2 Processo de decomposição de corpos humanos

A decomposição de corpos é um processo natural que ocorre nos organismos após a morte. A princípio, a degradação pode não ser perceptível a olho nu, dado que os eventos relacionados a este processo têm início em nível celular. As modificações no cadáver progredirão vagarosamente durante cada estágio da decomposição, caracterizando as diferentes alterações *post mortem* (TIBBETT; CARTER, 2008; FENOGLIO et al., 2010; HAU et al., 2014).

O corpo humano é composto, aproximadamente, por 64% água, 20% proteínas, 10% lipídios, 1% carboidratos e 5% minerais. Durante o processo de decomposição, estes constituintes são degradados em compostos mais simples, até a sua mineralização (composição básica de C, H, O, N, P e S). Tais eventos são estudados durante a decomposição química de cadáveres (STATHEROPOULOS et al., 2005; JANAWAY et al., 2009, IOAN, 2017).

A decomposição cadavérica é caracterizada por duas fases principais. A primeira é caracterizada pela autólise, que consiste na autodestruição célular, que se dá por meio da atividade de enzimas hidrolíticas. Em seguida, avança para a segunda fase denominada de putrefação, que implica na desintegração progressiva dos compostos orgânicos, que levam a mudanças de coloração do corpo, incluindo várias tonalidades de verde, roxo e marrom. O estímulo para a transição entre esses processos é a anóxia celular, que altera o fornecimento de oxigênio às células, favorecendo o desenvolvimento de bactérias anaeróbias no trato gastrointestinal e respiratório (CARTER; YELLOWLEES; TIBBETT, 2007; STADLER et al., 2013; HAU et al., 2014).

Diversos autores distinguem e caracterizam as fases e etapas do processo de putrefação com base em estudos de decomposição de carcaças de animais, como ratos (KEIPER, 1997; CARTER; YELLOWLEES; TIBBETT, 2008; Al-MEKHLAF, 2020), elefantes (COE, 1978),

macacos (LEE; MARZUKI, 1993; RUMIZA et al., 2010; AHMAD et al., 2011), porquinhos-da-índia (BORNEMISSZA, 1957; SÁNCHEZ-MACÍAS et al., 2019), cabras (DEONIER, 1940; REEVES, 2009; SINGH; BALA, 2019), coelhos (AHMAD; OMAR, 2018; ODO; ILOBA, 2020) e porcos domésticos (NOLAN et al., 2019; BARTON et al., 2020).

A definição do número de fases e as nomenclaturas usadas podem variar de acordo com o pesquisador e as diferenças geográficas. Assim, as fases podem ser classificadas em quatro a seis estágios diferentes (CARTER et al., 2007; HAU et al., 2014). Reed (1958) e Shean, Messinger e Papworth (1993), baseado em seus estudos com carcaças de porcos, descreveram a decomposição de corpos em quatro fases distintas: Fase fresca, inchaço corporal, decomposição avançada e esqueletização, enquanto Payne (1965) delineou o processo de putrefação, de acordo com seus estudos realizados com carcaças de filhotes de porco, em seis estágios: fresca, inchaço corporal, estágio de decomposição ativa, decomposição avançada, fase seca e remanescentes corporais. Galloway e seus colaboradores (1989, 1997) investigaram o padrão do processo de decomposição por meio de um estudo envolvendo diversos casos forenses e estabeleceram uma classificação onde as etapas foram categorizadas em cinco estágios: fresco, decomposição inicial, decomposição avançada (na qual ocorre o extravasamento de necrochorume), esqueletização e decomposição extrema (onde ocorre a destruição dos restos de esqueleto). Esta descrição ainda é amplamente utilizada na área da antropologia forense (WESCOTT, 2018).

A duração entre as fases e as transformações durante o processo de decomposição dos corpos humanos pode sofrer interferências por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Fatores intrínsecos afetam as mudanças *post mortem*, que incluem massa corpórea e as dimensões corporais. Já os extrínsecos, abrangem as vestimentas, isolamento do cadáver, ambiente em que o corpo se encontra e seu armazenamento após o óbito (REDDY; LOWENSTEIN, 2011, SUTHERLAND et al., 2013; ALMULHIM; MENEZES, 2020).

Outras particularidades que influenciam no tempo de cada fase e estágio da decomposição, descritas na literatura, são a idade, o conteúdo gástrico, o estado nutricional antes da morte, bem como a causa da morte. A temperatura, umidade, pH e composição do solo onde o cadáver foi inumado também são fatores relevantes, pois podem comprometer a evolução da decomposição química do corpo (VASS et al., 1992; 2002, 2008; PINHEIRO, 2006; IOAN, 2017).

3.3 Necrochorume

O necrochorume é um composto resultante do processo de decomposição de corpos, caracterizado pela coloração cinza-avermelhada, odor fétido e um elevado índice de patogenicidade. A relação entre o peso de um corpo e o volume de necrochorume produzido é de aproximadamente 0,60 L/Kg. Logo, um corpo adulto pesando, em média, 70 kg, produz durante sua decomposição, cerca de 30 litros de necrochorume, que em condições adequadas é decomposto em substâncias mais simples e inofensivas, conforme a capacidade de depuração do solo. (SILVA, 1998; CASTRO, 2008).

Este composto, que é formado principalmente no primeiro ano após o sepultamento, é constituído por 60% de água, 30% de sais minerais e 10% de substâncias orgânicas degradáveis. Dentre as substâncias orgânicas presentes neste líquido, destacam-se duas diaminas, a putrescina ($C_4H_{12}N_2$) e a cadaverina ($C_5H_{14}N_2$), consideradas tóxicas, por gerar íons de amônia quando degradadas (NH_4+) (SMITH, 1985). Em temperatura de 23 a 28 ºC, o necrochorume apresenta pH entre 5 e 9 e densidade média de 1,23 g/cm³ (mais denso que a água) (SILVA, 1998).

3.4 Aminas biogênicas: cadaverina e putrescina

Aminas biogênicas são compostos de baixo peso molecular, originados da descarboxilação de aminoácidos livres. São formados também pela aminação redutiva e trasaminação de aldeídos e cetonas ou como produtos da atividade de tecidos corporais. Em quantidades fisiológicas, estes compostos são essenciais às atividades do metabolismo celular de microrganismos, plantas e animais (BUŇKOVÁ et al., 2010; RABIE, 2011; SIROCCHI et al., 2013; FEDDERN et al., 2019; PARK; LEE; MAH, 2019). São fundamentais para diversos processos importantes do corpo humano, como a síntese de proteínas, ácidos nucléicos, manutenção do crescimento e divisão celular, regulação da pressão arterial e temperatura corporal. As aminas biogênicas também exercem influência na estabilidade da membrana celular e resposta a estresse (SILVA; GLORIA, 2002; NUÑEZ; DEL OLMO; CALZADA, 2016, WÓJCIK; ŁUKASIEWICZ; PUPPEL, 2020).

As aminas biogênicas também foram investigadas quanto ao seu potencial mutagênico em alimentos, pois na presença de nitritos, as aminas biogênicas, como a cadaverina e putrescina, se tornam reativas, dando origem a substâncias carcinogênicas, conhecidas como nitrosaminas. Devido a este fato, as aminas biogênicas são consideradas potencialmente

cancerígenas para diversas espécies de animais e representam um risco em potencial à saúde humana (SHALABY, 1996; LEE et al., 2003; RUIZ-CAPILLAS; HERRERO, 2019).

As aminas biogênicas de maior interesse são histamina, putrescina, cadaverina, agmatima, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermina e espermidina. Dentre as aminas biogênicas citadas, a histamina, feniletilamina e triptamina estão relacionadas à produção de gases (CH_4 e CO_2), ao passo que as diaminas cadaverina e putrescina, descobertas em 1885 pelo médico alemão Ludwing Bieger, são responsáveis pelo cheiro fétido característico de corpos em putrefação (STATHEROPOULOS; SPILIOPOULOU; AGAPIOU, 2005; FORBES, 2008; STADLER et al., 2013; ION, 2017).

Estes compostos aminados podem ser classificados de acordo com o número total de grupos aminas, sendo categorizados como monoaminas, diaminas e poliaminas. Em relação à sua estrutura química, podem apresentar uma configuração alifática, aromática e heterocíclicas (NAILA et al., 2010, NUÑEZ; DEL OLMO; CALZADA, 2016; EKICI; OMER, 2020).

As aminas cadaverina e putrescina também foram estudadas para detectar o nível de decomposição, a toxicidade e a procedência de alimentos (DEL RIO et al., 2019; SUDALAIMANI et al., 2020). Além disso, estas aminas biogênicas foram detectadas em baixos níveis na cavidade oral de seres humanos vivos, sendo relacionadas ao mau hálito (GOLDBERG et al., 1994; COOKE; LEEVES; WHITE, 2003).

3.5 Utilização do porco doméstico como modelo animal

Diversos animais têm sido amplamente utilizados, ao longo da história, como modelos em pesquisas científicas, na inteção de se obter informações que possam ser extrapoladas para a espécie humana. Exemplo dessa utilização, são os estudos de desenvolvimento de fármacos, cálculo de dosagem de medicamentos e estratégias de tratamento de doenças (VAN DER WORP et al., 2010; MCGONIGLE; RUGGERI, 2014). Modelos animais também são comumente utilizados na pesquisa forense. Isto se deve aos estudos que envolvem o processo de decomposição humana, onde o uso de animais tem sido fundamental para a compreensão das alterações *post mortem* (BROOKS, 2016; PROBST et al., 2020), sucessão da entomofauna cadavérica (SILAHUDDIN et al, 2015; WANG et al., 2019) e sucessão microbiana (METCALF et al., 2015; YANG et al., 2019).

O porco doméstico tem sido cada vez mais utilizado como modelo em estudos que envolvem o processo de decomposição de corpos. Isto se deve às suas semelhanças com a

espécie humana, como tamanho e peso similares aos de uma pessoa, distribuição da gordura corporal, ausência da pelagem grossa e microbiota intestinal resultante da dieta onívora. Além disso, a composição histológica, anatomia interna e sistema imunológico também justificam a utilização desses animais em processos experimentais (SCHOENLY et al, 2006; ZHANG; WIDMER; TZIPORI, 2013; BELK et al, 2019).

Estudos recentes, como os de Barton et al. (2020), demonstram a utilização e adequação dos porcos domésticos como modelo animal na avaliação forense. Para esse estudo, os autores utilizaram cinco cadáveres humanos e três carcaças suínas inumados em profundidades distintas no solo. Após a avaliação de diversos parâmetros, os autores concluíram que a umidade do solo, a condutividade elétrica (do extrato aquoso do solo) e as concentrações de nitrato, amônia e fósforo total foram maiores nas porções de solo coletados diretamente sob os cadáveres. A evidência de quantidades elevadas de nutrientes no solo permaneceu por 700 dias, indicando que esses compostos podem constituir marcadores úteis de localização de ilhas de decomposição, por um período de até 2 anos.

Nolan et al. (2019) realizaram um estudo preliminar, em condições controladas em laboratório, sobre a presença de peptídeos presentes no necrochorume. Nesse estudo foram utilizadas quatro carcaças de porco doméstico para simular as etapas da decomposição humana ao longo do experimento. Os autores concluíram que a identificação de peptídeos, durante o processo de decomposição de carcaça suína, apresenta-se como bom potencial para estimar o intervalo pós-morte.

3.6 Bioindicadores vegetais

3.6.1 *Allium cepa*

Os organismos vegetais são utilizados como bioindicadores de efeitos tóxicos de agentes químicos e de amostras ambientais. Stadler (1928) foi o primeiro pesquisador a usar um organismo vegetal (milho) para avaliar efeitos do raio-X sobre os cromossomos**.** Levan (1938) foi também o primeiro pesquisador a usar a espécie *Allium cepa* para investigar a atividade mitótica destes organismos.

Desde então, o sistema-teste *A. cepa* vem sendo muito utilizado em avaliações de agentes com potencialidade tóxica. Fiskesjo (1985) propôs o uso desta planta para monitorar diversas substâncias potencialmente tóxicas. A partir dessas avaliações, a United Nations

Environment Program (UNEP), juntamente com a World Health Organization (WHO) e a United States Environmental Protection Agency (USEPA) desenvolveram um estudo conjunto abordando a aplicabilidade de sistemas-teste vegetais para o monitoramento e triagem de contaminantes ambientais (GRANT, 1982; 1999; MA, 1999).

A espécie *A. cepa* é considerada um excelente bioindicador na avaliação da citogenotoxicidade de compostos tóxicos e de amostras ambientais, por reunir interessantes características, como cromossomos grandes e em número reduzido (2n=16), o que favorece a visualização das possíveis alterações do ciclo celular. Além disso, é um teste de resposta rápida, de fácil manuseio e baixo custo (LEME, MARIN-MORALES, 2009). Os ensaios com *A. cepa* também são considerados muito preditivos para avaliação de toxicidade, pois apresentam boa correlação com efeitos observados em outros organismos, como, por exemplo, em células de mamíferos. Esta modalidade de ensaio também permite avaliar e descrever os efeitos adversos de compostos químicos, por meio da observação de aberrações cromossômicas (PALMIERI et al., 2016; CABUGA JR et al., 2017).

Diferentes estudos têm utilizado o ensaio de *A. cepa* como uma metodologia bastante eficaz para mensurar o potencial citogenotóxico e mutagênico de contaminantes ambientais. Datta et al. (2018) utilizaram o ensaio de *A. cepa* para avaliar os efeitos genotóxicos de solos tratados com pesticidas; Sommaggio et al. (2018) avaliaram a degradabilidade e a diminuição da toxicidade de lodo de esgoto bioestimulado com bagaço de cana-de-açúcar; Yadav et al. (2019) avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade de águas residuais de cortume; e Alderete (2020) investigaram a toxicidade e mutagenicidade de efluente sintético contaminado com corante azo, após exposição a tratamento por processos oxidativos avançados.

3.6.2 *Lactuca sativa*

Dentre os ensaios que utilizam plantas superiores, o teste com *L. sativa* é um dos mais utilizados e bem avaliados. A espécie *L. sativa* é um modelo vegetal recomendado internacionalmente por várias organizações internacionais para avaliar e monitorar efeito ecotoxicológico de poluentes ambientais (OECD, 1984; ISO, 1995; USEPA, 1996). Os ensaios com esse bioindicador, além de ser de fácil realização, permitem a obtenção de resultados em curto espaço de tempo (CHARLES et al., 2011; PARK et al., 2016).

A avaliação desse ensaio é macroscópica, pois é feita pela observação da inibição da germinação de sementes e pela medição do alongamento das radículas e do hipocótilo (ARAGÃO et al., 2015).

Os parâmetros germinação de sementes, alongamento da radícula e do hipocótilo, obtidos com o bioindicador *L. sativa*, foram utilizados por Chan-Keb et al. (2018), para avaliar a fitoxicidade da água e do extrato aquoso de sedimentos do rio Champotón, localizado na cidade de Campeche, México. Kim, Min e Kim (2018) avaliaram, por meio de ensaios com *L. sativa*, a atividade fitotóxica da aplicação simultânea de fósforo (P) e ferro (Fe) em solo contaminado com arsênio (As).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimento de inumação

O experimento de inumação foi realizado no Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Rio Claro/SP, Brasil (lat 23°23’47”S e long 47°32’41”O). Para a simulação de sepultamento, foi utilizada uma carcaça suína recém-abatida, pesando cerca de 11 kg, obtida em um abatedouro local licenciado, portanto, não exigindo aprovação ética.

A carcaça utilizada neste ensaio foi disposta verticalmente em uma estrutura cilíndrica de aço galvanizado, de 2 m de altura por 0,5 m de diâmetro, conforme Figura 1 – A.

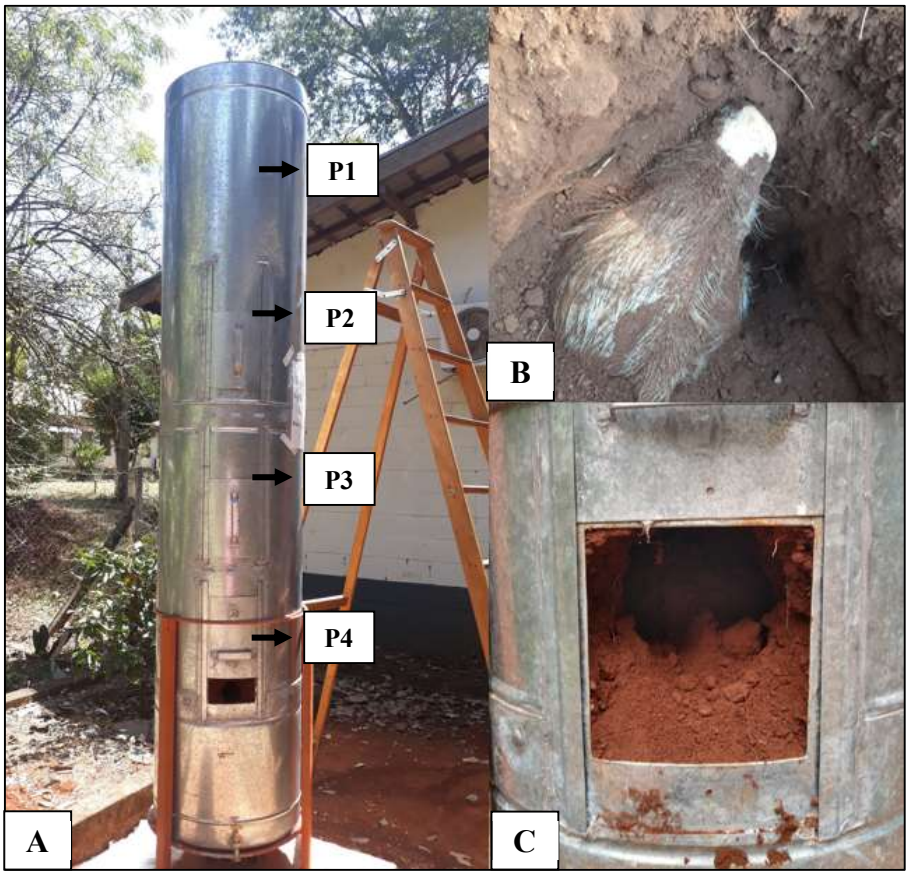


Figura 1: Local do experimento. A: Estrutura de aço utilizada para o experimento de inumação da carcaça suína e identificação dos pontos de coleta (P1, P2, P3 E P4); B: carcaça suína disposta na estrutura; C: imagem aproximada de uma das "janelas" de coleta. Fonte: Registrado pela própria autora.

A tubulação foi vedada em sua base, para impedir o extravasamento de qualquer material derivado da putrefação para fora do sistema e, consequentemente a contaminação do solo ou o lençol freático do local. O fundo da tubulação foi revestido com uma camada, de aproximadamente 20 cm, de esferas de vidro com 20 mm de diâmetro, para simular a região de granulação do solo e também para facilitar o escoamento dos possíveis líquidos necrochorume gerados durante processo de putrefação. Logo acima da camada de esferas de vidro foi iniciada a colocação do solo referência (coletado no Jardim Experimental da UNESP do campus de Rio Claro/SP), até preencher cerca de 1,5 m da altura do tubo. Por fim, a carcaça foi disposta na parte apical da estrutura e recoberta com cerca de 0,50 cm do mesmo solo.

O tubo possui “janelas” ao longo de seu comprimento, que foram instaladas a cada 50 cm, totalizando 3 janelas (0,50, 1,0 e 1,5 m de distância da base do tubo - Figura 1: P2, P3 e P4), que foram usadas para a coleta de solo nas diversas profundidades da tubulação, que representaram as diferentes distâncias da carcaça em diferentes tempos da pecolagem. Na base do tubo foi instalada uma torneira, para a coleta de eventuais substâncias lixiviadas, porém os produtos resultantes da decomposição da carcaça percolaram até essa região, fato que impediu tal coleta.

A inumação da carcaça suína foi realizada em 14/08/2019. As coletas de solo foram realizadas nos quatro pontos de coleta (P1- localizado na superfície do cilindro, portanto mais próximo da carcaça suína; P2 – a 1,5 m da base do cilindro; P3 – a 1m da base do cilindro; P4 – a 0,50 m da base do cilindro), em três tempos distintos (T1: 26/08/2019, 12 dias após a inumação; T2: 13/09/2019, 30 dias após a inumação e T3: 12/11/2019, 90 dias após a inumação). Juntamente com as amostras coletadas, foram realizados ensaios com o solo referência (controle ambiental), cujos resultados foram comparados com os dos tratamentos. A realização do experimento em tubulação foi uma forma de garantir a coleta criteriosa do solo, nas diferentes etapas e tempos do processo de decomposição da carcaça.

4.2 Cálculo do peso seco

Para a verificação do conteúdo de água presente nas amostras estudadas e preparo do extrato aquoso, foi necessário calcular o peso seco dos solos amostrados. Primeiramente, foram pesadas em placas de Petri 10 g de cada amostra que permaneceram em estufa a 105 °C por 24 h. Decorrido este período, as placas foram pesadas em balança de precisão. Esse processo foi repetido, até que não houvesse mais variação no peso das amostras. Para evitar que as amostras incorporassem a umidade do ambiente em sua massa, foi feito o seu resfriamento em um dissecador. O cálculo do conteúdo da água existente na amostra foi feito pela diferença entre o peso inicial e peso registrado final. Esta etapa foi realizada em triplicata.

4.3 Obtenção do extrato aquoso (ABNT, 2004 – Norma NBR 10.006)

Os extratos aquosos das amostras dos solos, obtidos na simulação de decomposição realizada com carcaça suína (Figura 1 - B) foram preparados misturando, em um béquer de 500 mL, 125 g de solo (considerando o peso seco das amostras) em 500 mL de água destilada. As soluções foram agitadas continuamente, em baixa velocidade, por um período de 5 minutos.

Após 7 dias de decantação, as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm de porosidade e os extratos aquosos obtidos foram utilizados nos bioensaios (Figura 2).

Figura 2: Extratos aquosos obtidos após o período de decantação. Fonte: Registrado pela própria autora.

4.4 Capacidade de retenção de água do solo (WHC) (ABNT NBR ISO 11269 - 2:2014)

Para o cálculo da capacidade máxima de retenção de água no solo (Water Holding Capacity – WHC), os cadinhos foram preenchidos com solo e submersos em um recipiente com água à temperatura ambiente (nível da água abaixo da borda dos cadinhos), por um período de 2 h. Em seguida, foram mergulhados abaixo do nível da água, durante 1 h. Para drenar a água, os cadinhos foram colocados em uma peneira sobre um recipiente, por 2h (Figura 3). Ao final, as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C, até obter massa constante. A capacidade de retenção de água foi então calculada como a porcentagem de massa seca. Esta etapa foi realizada em triplicata, sendo estabelecida para os testes WHC (70%).

Para a realização deste ensaio, o tubo e papel de filtro recomendado pela norma foi substituído por cadinhos com pedra porosa de porosidade 1 (100-160 µm), processo esse também indicado pelo ensaio.

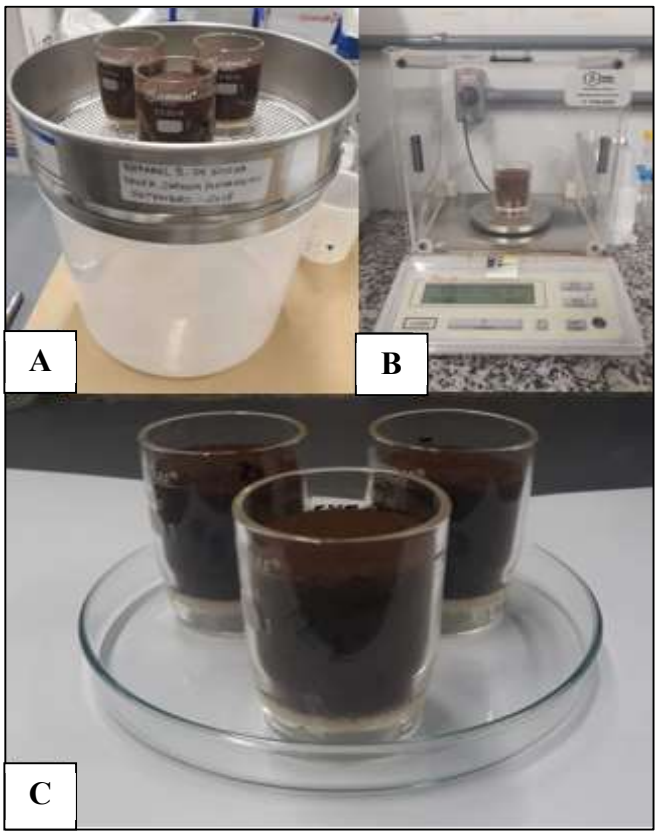


Figura 3: Obtenção da capacidade máxima de retenção de água. A: drenagem da água; B: pesagem da amostra; C: cadinhos utilizados para o cálculo da WHC. Fonte: Registrado pela própria autora.

4.5 Teste de germinação e alongamento radicular e de hipocótilo em *Lactuca sativa*

O bioensaio com *L. sativa* foi realizado com sementes da variedade Grand rapids (Isla). Para este ensaio, foram expostas à germinação 20 sementes de *L. sativa* por placa de Petri preenchidas com dois tipos de amostras: 30 g de solo obtidos no processo de decomposição da carcaça suína e papéis de filtro embebidos com 4 ml dos extratos aquosos obtidos das amostras de solo. As placas foram incubadas em BOD por 120 h, a uma temperatura de 22 +/- 2 °C, sem fotoperíodo. O controle negativo (CN) foi realizado com água destilada, o controle ambiental (CA) com solo referência e o controle positivo (CP) com sulfato de zinco heptaidratado (0,005M - $ZnSO_4 7H_2O$). O ensaio foi realizado em triplicata e de maneira inteiramente cazualizada. Após o período de incubação, foram contabilizadas as sementes germinadas, para a obtenção da porcentagem de germinação (relação entre o número de sementes germinadas/total de sementes dispostas por placa x 100).

Para a análise de alongamento, foram aferidos, com o auxílio de um paquímetro digital, os comprimentos das radículas e dos hipocótilos, de todas as sementes germinadas. Os resultados destas análises foram utilizados para estimar o crescimento radicular e do hipocótilo. Os dados foram avaliados usando o software STATISTICA 7.0 para as análises de normalidade e homogeneidade de variância, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente. Para a análise de significância das diferenças registradas para a germinação, comprimento da radícula e do hipocótilo e, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p<0,05$), pelo programa estatístico GraphPad Prism 8 (versão 8.0.1).

4.6 Ensaio com o organismo teste *Allium cepa*

Para os ensaios de *A. cepa*, 100 sementes, da variedade Baia periforme (Isla), foram dispostas em placas de Petri preenchidas com, aproximadamente, 30 g de solos, assim como no ensaio com *L. sativa*, porém o volume utilizado do extrato aquoso foi de 5 ml. Os tratamentos controles foram realizados em água destilada (Controle Negativo – CN), em solo referência usado para preencher a tubulação de aço descrita anteriormente (controle ambiental – CA), em Trifluralina (na concentração de 0,84 mg/L) para o controle positivo (CP). As placas foram incubadas em BOD por 5 dias, a uma temperatura de 22 +/- 2 °C, com fotoperíodo de 12 h.

Após a germinação, as radículas com cerca de 2,0 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético glacial, 3:1, v/v), por um período de 6 horas, em temperatura ambiente. Após este tempo, foi realizada a troca do fixador por um recém-preparado, para posterior armazenamento das raízes a 4 °C, até a sua utilização na confecção das lâminas.

4.7 Teste de Aberrações Cromossômicas e de Micronúcleos em células meristemáticas

Os testes de Aberrações Cromossômicas (AC) e de Micronúcleos (MN), realizados com células meristemáticas de radículas de *A. cepa,* foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes fixadas passaram por três banhos de 3 minutos em água destilada, para a retirada do excesso do fixador; hidrolisadas a 60 °C em HCl 1N por 10 minutos e submetidas à reação de Schiff por 2h. Em seguida, as radículas coradas foram lavadas em banhos consecutivos de água destilada, até a retirada do excesso do reativo de Schiff. Na sequência, as radículas foram dispostas em lâminas

onde os meristemas radiculares foram seccionados. Por fim, foi colocada uma gota de carmim acético (2%) e os meristemas recobertos com lamínula e suavemente esmagados (um meristema/lâmina). As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas permanentes montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas sob microscopia de luz.

4.8 Análise dos resultados

Para análise dos resultados do teste de AC, foram considerados diferentes tipos de aberrações, como, perdas, quebras, pontes, aderências cromossômicas, entre outros, que foram observados durante as fases de divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). Como *endpoint* de genotoxicidade, foram consideradas todas as aberrações cromossômicas encontradas, exceto as quebras cromossômicas.

A presença de quebras cromossômicas e de MN serviu como parâmetro de mutagenicidade. O índice mitótico (IM), obtido pela razão do número de células em divisão sobre o número total de células analisadas, constituiu o parâmetro de citotoxicidade das amostras.

Os parâmetros citados foram obtidos pela contagem de cerca de 500 células por lâmina, para um total de 12 lâminas avaliadas/tratamento, totalizando cerca de 6.000 células/tratamento, o que totalizou 432 lâminas analisadas. Os dados foram avaliados usando o software STATISTICA 7.0 para as análises de normalidade e homogeneidade de variância, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p<0,05$), pelo programa estatístico GraphPad Prism 8 (versão 8.0.1), conforme sugerido por Mazzeo e Marin-Morales (2015) e de Moraes Cunha Gonçalves et al. (2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho estão apresentados na forma dos seguintes artigos:

Artigo 1: Aminas biogênicas envolvidas em processos putrefativos não morrem com a gente

Artigo 2: Avaliação da fitotoxicidade e citogenotoxicidade de solo: Uma simulação dos impactos da decomposição cadavérica

Artigo 1: Aminas biogênicas envolvidas em processos putrefativos não morrem com gente

Letícia Rosa De Souza[1, 2], Maria Aparecida Marin-Morales[1, 2]
[1] Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, SP, (Brasil);
[2] Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP (UNESP).

RESUMO

Aminas biogênicas são substâncias orgânicas comumente encontradas em plantas e animais que, muitas vezes, persistem também nos alimentos. Elas são geradas por processos de descarboxilação de aminoácidos livres. Apesar de muitas delas serem essenciais para diversos processos fisiológicos do organismo (viabilidade celular, síntese de proteínas, replicação de DNA, dentre outros), o seu consumo excessivo, quando presentes em alimentos em putrefação, representa um risco à saúde humana, devido ao seu potencial tóxico. Além da importância de seu estudo na área de alimentos, as aminas biogênicas também estão relacionadas ao processo de decomposição de corpos, sendo componente de um dos seus principais produtos, o necrochorume. Aminas biogênicas tóxicas, como a cadaverina e putrescina, estão presentes neste líquido, que é considerado uma das principais fontes poluidoras da atividade cemiterial. Devido aos efeitos nocivos já comprovados das aminas biogênicas à saúde, junto à sua relevância no processo de decomposição de corpos e a escassez de estudos na área ambiental, o presente artigo de revisão tem como objetivo sintetizar informações sobre à sua estrutura, caracterização e classificação química; origem e biossíntese; importância em processos biológicos; toxicologia e riscos para saúde humana; comprometimento da qualidade ambiental; metodologias de detecção e quantificação e suas possíveis relações com processos carcinogênicos.

Palavras-chave: cadaverina, contaminação ambiental, decomposição de corpos, necrochorume, poliaminas, putrescina, toxicologia alimentar.

ABSTRACT

Biogenic amines are organic substances commonly found in plants and animals that often persist in foods as well. These compounds are generated by free amino acid decarboxylation processes. Although many of them are essential for various physiological processes in the body (cellular viability, protein synthesis, DNA replication, among others), their excessive consumption, when present in putrefying foods, represents a risk to human health, due to its toxic potential. In addition to the importance of its study in the food area, biogenic amines are also related to the body decomposition process, being one of the main components of the necroslurry. Toxic biogenic amines, such as cadaverine and putrescine, are present in this liquid, considered one of the main polluting sources of cemeteries. Due to the already proven harmful effects of biogenic amines on health, combined with their production in the process of decomposition of bodies and the lack of studies in the environmental area, this review article aims to synthesize information about their structure, characterization and chemistry classification ; origin and biosynthesis; importance in biological processes; toxicology and risks to human health; impacts on environmental quality; detection and quantification methodologies and its possible relationships with cancerous processes.

Keywords: cadaverine, cemetery leachate, decomposition of bodies, environmental contamination, food toxicology, polyamines, putrescine,

1 INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas são substâncias nitrogenadas básicas, de estruturas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas (LORENZO et al. 2007, NAILA e al. 2010), não voláteis e de baixo peso molecular, derivadas da atividade de enzimas que descarboxilam aminoácidos livres (GOMES et al., 2014; RÊGO et al., 2014; FEDDERN et al., 2019). As aminas biogênicas também podem ser formadas e degradadas durante o metabolismo celular de animais, plantas e microrganismos, principalmente pela descarboxilação térmica de aminoácidos, mas também por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (TEN BRINK et al., 1990; AHMAD et al., 2020).

As aminas biogênicas, em condições fisiológicas, estão diretamente relacionada a importantes funções biológicas, dentre elas, as sínteses de proteínas, hormônios e ácidos nucleicos. Elas também auxiliam no crescimento e diferenciação celular, manutenção da temperatura corporal e pressão arterial, regulam a expressão gênica, influenciam na estabilidade da membrana plasmática, na resposta ao estresse e na senescência, além de atuarem, sobretudo, como neurotransmissores (NUÑEZ; DEL OLMO; CALZADA, 2015; WÓJCIK; ŁUKASIEWICZ; PUPPEL, 2021). Em vegetais participam do processo de floração, desenvolvimento do fruto, resposta ao estresse e síntese de metabólitos secundários (SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2018).

Apesar de serem imprescindíveis em diversos processos fisiológicos específicos, as aminas biogênicas são consideradas biomoléculas tóxicas, que podem induzir efeitos adversos à saúde. Tais efeitos podem ser constatados após ingestão demasiada de alimentos contaminados ou pela inibição de mecanismos catabólicos (SHALABY, 1996; BENKERROUM, 2016).

Os alimentos de origem animal são naturalmente ricos em aminoácidos livres, portanto passíveis de se contaminarem por aminas biogênicas. Em carnes e peixes, por exemplo, o teor de aminas biogênicas aumenta, após a morte do animal, devido à ação de uma elevada quantidade de enzimas proteolíticas presentes no trato intestinal, que promovem a destruição das células (SMITH; TAPIA-SALAZAR; RICQUE-MARIE, 2000; VINCI; ANTONELLI, 2002).

As transformações químicas que ocorrem em processos de decomposição de cadáveres, embora envolva reações mais complexas, se assemelham muito aos processos de putrefação de alimentos, pois também promovem quebra de proteínas, carboidratos e

lipídios (SABUCEDO; FURTON, 2003). Os subprodutos intermediários da proteólise são as aminas biogênicas (STUART, 2013; NOLAN et al., 2020a). Nessa classe químicas, se destacam as aminas cadaverina e putrescina, que são também constituintes do líquido formado durante a decomposição cadavérica, denominado de necrochorume (KEMERICH et al., 2014; NOLAN et al., 2020). Ambas as aminas estão relacionadas com o potencial tóxico e o odor fétido característico dos processos putrefativos e, por serem carreadas por percolação do necrochorume, estão, geralmente, presentes em solos onde existem corpos em decomposição (GILL-KING, 1999; FORBES, 2008; IOAN et al., 2017). Tais compostos são capazes de causar impactos, que são mais perceptíveis nas zonas mais aeradas e superficiais do solo (zonas vadosas) ou em aquíferos de áreas contíguas aos cemitérios (DENT; FORBES; STUART, 2004; IDEHEN; EZENWA, 2019; NECKEL et al., 2017; ZYCHOWSKI, 2012).

Em vista da necessidade de mais estudos sobre os impactos das aminas biogênicas em ambientes onde ocorre a putrefação de corpos, como os cemitérios, a presente revisão tem como objetivo levantar informações gerais e relevantes sobre estes compostos, em diferentes áreas do conhecimento. Serão abordadas neste revisão as principais aminas biogênicas (histamina, tiramina, cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, feniletilamina, triptamina e agmatina) relacionadas a processos de putrefação de alimentos e decomposição de corpos, além de aspectos que possam contribuir para um melhor conhecimento desses compostos, quanto às suas estruturas, caracterizações e classificação química; sua origem e biossíntese; importância em processos biológicos; toxicologia e riscos para saúde humana; metodologia de detecção e quantificação; e suas possíveis relações com processos carcinogênicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As aminas biogênicas (histamina, tiramina, cadaverina, putrescina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina) descritas neste estudo foram selecionadas de acordo com sua relevância em diferentes áreas de conhecimento, como: toxicologia alimentar, tafonomia, ciência forense e contaminação ambiental de cemitérios.

O levantamento das informações foi realizado em bases de dados científicos disponíveis, como PubMed, SciELO, Google Scholar, NCBI, Springerlink e Elsevier.

3 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS

Em termos de origem ou síntese, as aminas biogênicas são subdivididas em dois grupos: as de formação endógena ou exógena. No primeiro grupo (endógenas), estão as pequenas aminas alifáticas putrescina, agmatina, espermidina e espermina, derivadas do aminoácido ornitina, e a agmatina, derivada da arginina. Essas aminas recebem o nome geral de poliaminas. As poliaminas são formadas em processos fisiológicos celulares de todos tecidos orgânicos e desempenham papéis importantes como neurotransmissores, e reguladores da expressão gênica; bloqueadores de canais iônicos de cálcio e reguladores de apoptose; proliferação, crescimento e diferenciação celular; secreções gástricas; resposta imune, processos inflamatórios, psicoativo e vasoativo. Também estão presentes em alimentos como carnes, peixes e frutas. Já no segundo grupo (exógenos), são classificadas com o nome genérico de aminas biogênicas que são formadas pela descarboxilação de aminoácidos livres (SANTOS, 1996; CASERO; MARTON, 2007; LARQUÉ et al., 2007; NUÑEZ; DEL OLMO; CALZADA, 2015; OZCELIK; TEMEL; KALE, 2020).

As aminas biogênicas podem ser classificadas quanto ao o número de grupamentos amina e quanto à sua estrutura química. Quanto ao número de grupos amina na molécula, elas podem ser classificadas como: monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (agmatina, espermidina e espermina) (CASERO; MARTON, 2007; LARQUÉ et al., 2007). De acordo com a sua estrutura química, as aminas biogênicas podem ser do tipo: alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina e espermina, agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina) (BOVER-CID et al., 2014; FEDDERN et al., 2019). A nomenclatura de cada amina biogênica está associada ao seu aminoácido precursor (BOVER-CID et al., 2014), como apresentado na Figura 1 a seguir:

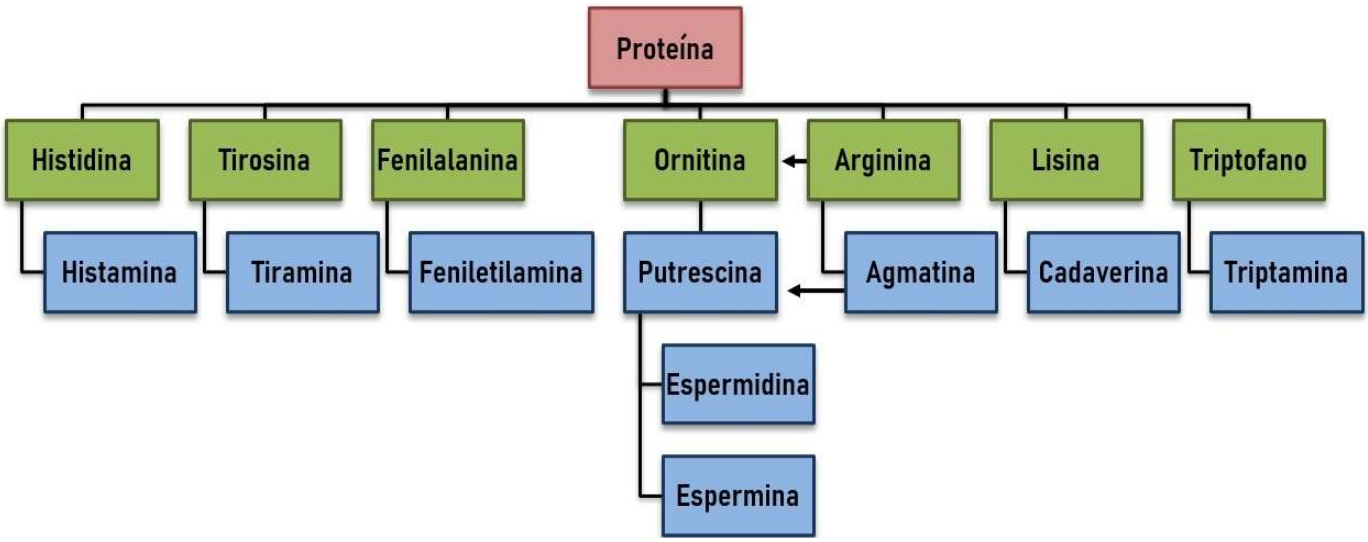
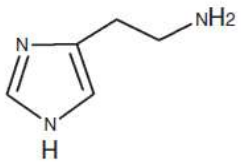
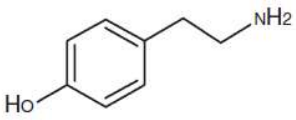
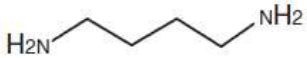
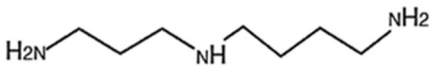
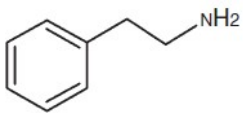
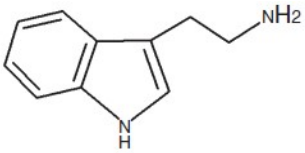
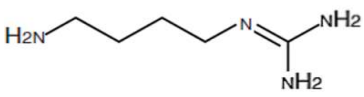


Figura 1: Esquema de formação de aminas biogênicas a partir de seus aminoácidos precursores. Caixa verde: aminoácidos precursores das aminas biogênicas. Caixa azul: aminas biogênicas formadas pelo processo de descarboxilação de aminoácidos livres. Fonte: Elaborado pela própria autora (2021).

No quadro 1 estão apresentados os nomes de cada amina descrita neste trabalho, seguido de suas estruturas químicas e fórmulas moleculares.

Quadro 1 Informações gerais sobre as aminas biogênicas (AB): Histamina (HIS), Tiramina (TIR), Cadaverina (CAD), Putrescina (PUT), Espermidina (EPD), Espermina (EPM), Feniletilamina (FEA), Triptamina (TRI) e Agmatina (AGM).

AB	Estrutura química	Fórmula molecular
HIS		$C_5H_9N_3$
TIR		$C_8H_{11}NO$
CAD		$C_5H_{14}N_2$
PUT		$C_4H_{12}N_2$
EPD		$C_7H_{19}N_3$
EPM		$C_{10}H_{26}N_4$
FEA		$C_8H_{11}N$
TRI		$C_{10}H_{12}N_2O$
AGM		$C_5H_{14}N_4$

Fonte: Elaborado pela própria autora (2021).

4 FORMAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS

4.1 Alimentos

Conforme citado anteriormente, as aminas biogênicas são resultantes de processos de descarboxilação de aminoácidos livres, promovidos por enzimas produzidas por cepas de microrganismos específicos, representados, principalmente, por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Estes compostos podem ser encontrados em uma ampla diversidade de alimentos e bebidas (carnes, peixes, frutos do mar, queijos, vegetais, vinhos e cervejas). Sua formação pode estar relacionada a vários fatores, como a qualidade da matéria-prima, os microrganismos presentes e as condições de processamento e armazenamento do alimento (SMITH; TAPIA-SALAZAR; RICQUE-MARIE, 2000; RUIZ-CAPILLAS; HERRERO, 2019).

Durante o processo de putrefação dos alimentos, os microrganismos ali presentes podem produzir, por metabolização das proteínas, uma elevada quantidade de aminas biogênicas. (STADNIK; DOLATOWSKI, 2010). Isso acontece porque a proteólise, promovida pelas enzimas autóctones e microbianas, libera uma grande quantidade de aminoácidos precursores das aminas. Esses aminoácidos livres, acidificam ligeiramente o meio, permitindo a ação das bactérias lácticas, que dominam nos primeiros estágios da putrefação (LORENZO et al., 2016). Dentre os fatores que mais contribuem para o desenvolvimento destes microrganismos estão os relacionados, principalmente, com as condições sanitárias do ambiente onde se encontram os alimentos (RUIZ-CAPILLAS; HERRERO, 2019; WÓJCIK; ŁUKASIEWICZ; PUPPEL, 2021).

Muitos dos microrganismos capazes de produzir aminas biogênicas por descarboxilação pertencem aos gêneros *Listeria*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Vibrio* e *Staphylococcu*s. Neste processo, também são destacadas algumas espécies de bactérias láticas, como *Lactobacillus fuchuensis*, *Lactococcus piscium*, *Leuconostoc gelidum* e *Carnobacterium alterfunditum* (SANTOS, 1996; COTTER; HILL, 2003; STADNIK; DOLATOWSKI, 2010; KULEY et al., 2012).

O fator que mais influencia na formação de aminas biogênicas em alimentos, é a temperatura em que eles são armazenados. Em temperaturas baixas, há uma inibição do crescimento bacteriano, que leva a uma redução na presença de enzimas proteolíticas do meio e uma consequente diminuição na formação dessas aminas (NAILA et al., 2010;

AHMAD et al., 2020). As temperaturas que mais favorecem a produção de aminas biogênicas, por atividade microbiana, são as que estão entre 20 a 37 °C. Já as temperaturas que mais inibem, são as que estão abaixo de 5 °C e acima de 40 ºC (KAROVIČOVÁ; KOHAJDOVÁ, 2005).

Além da temperatura, outros fatores como pH, umidade, suprimento de oxigênio, procedência do alimento, técnicas de produção, conservantes, aditivos químicos, também podem influenciar na formação das aminas biogênicas que se estabelecem nos alimentos. O pH é o fator que mais afeta a descarboxilação dos aminoácidos. Em condições de baixo pH, os microrganismos produzem mais descarboxilase, como parte de seu mecanismo protetor contra a acidez do meio (VISCIANO et al., 2012; ÖZOGUL; HAMED, 2018).

A detecção de aminas biogênicas em alimentos é muito importante, pois só pelo fato de estarem presentes nos produtos alimentícios, elas já oferecem informações sobre a qualidade e, consequentemente, dos possíveis perigos da ingestão desses produtos (EKICI; OMER, 2020).

4.2 Processo putrefativo de corpos

O processo de decomposição de corpos apresenta duas principais fases, a autólise e a putrefação. A primeira fase, consiste na autodestruição celular por atividade enzimática. Esse processo se inicia quando se estabelece uma ausência de oxigênio no meio celular (anóxia), fator esse que leva a perda da estrutura da membrana (autólise). Esse processo é, primeiramente, observado nas células com maior atividade metabólica (GALLOWAY et al., 1989). A ausência de oxigênio favorece a ocorrência microrganismos anaeróbios, como *Bacteroides* e *Clostridium,* presentes no trato gastrointestinal e respiratório (SWANN et al., 2010, HAU et al., 2014; IOAN et al., 2017).

O processo putrefativo pode ser divido em cinco estágios: fresco, decomposição inicial, decomposição avançada, esqueletização e decomposição extrema. A duração de cada um desses estágios pode estar relacionada, diretamente, com as características do próprio corpo e do ambiente adjacente. Com relação aos fatores de interferência corpórea, destacam-se o conteúdo gástrico, as vestimentas do cadáver, as dimensões corporais, bem como a causa da morte (VASS et al., 2002; PINHEIRO, 2005). Dentre as características ambientais, as mais relevantes para as transformações químicas do processo de putrefação são a temperatura, a umidade, o pH e a composição do solo (VASS et al., 2008; PACZKOWSKI;

SCHÜTZ, 2011). No Quadro 2 estão apresentados os estágios e as características das cinco fases do processo de putrefação citados.

Quadro 2 Fases da putrefação e suas características.

Fase	Características gerais	Período de decomposição
Fresca	Sem atividade da entomofauna cadavérica; mínimas mudanças macroscópicas no corpo.	Em até 3 dias.
Decomposição inicial	Mudança da coloração corporal para tons de cinza e verde; inchaço devido ao acúmulo de gás no abdômen;	A partir de 1 semana.
Decomposição avançada	Intensa atividade de insetos; forte odor; liberação de material cadavérico (necrochorume).	A partir de 3 semanas.
Esqueletização	Ossos com tecido dessecado ou tecido mumificado, que recobrem menos da metade do esqueleto;	De 1 a 6 meses.
Decomposição extrema	Início da destruição dos remanescentes ósseos.	De alguns meses a anos.

Fonte: Galloway (1989).

Como descrito no Quadro 2, o estágio de decomposição avançada conta com a intensa atividade de insetos pois, nesta fase, os produtos da putrefação, como as aminas biogênicas, são mais perceptíveis para esses organismos, que são atraídos pelos odores fortes exalados pelo necrochorume (VASS et al., 1992). O necrochorume liberado se acumula ao redor do corpo, criando uma ilha de decomposição (Cadaver Decomposition Island - CDI), momento este em que se intensifica a lixiviação dos fluidos corpóreos para o solo (GOFF, 2009). É nesta fase também que ocorrem as transformações químicas dos elementos proteicos, por processos proteolíticos. As proteínas hidrolisam-se em proteoses, peptonas, polipepitídeos e por fim, em aminoácidos (SABUCEDO; FURTON, 2003). Os aminoácidos, por sua vez, sofrem descarboxilação, resultando na produção de aminas biogênicas, como a cadaverina, putrescina, tiramina, triptamina, histamina, espermidina, espermina, feniletilamina e agmatina (STADLER et al., 2013). A histamina e a feniletilamina estão relacionadas com a formação de gases metano e dióxido de carbono, enquanto que a cadaverina e putrescina exalam o cheiro característico de corpos em putrefação (WISMAN; SHIRIRA, 2015; NOLAN et al., 2020b).

Perante o exposto, os cemitérios apresentam risco em potencial ao meio ambiente e à população, principalmente para trabalhadores do local e para a população que vive em seu entorno, por serem locais onde corpos humanos sofrem diversas transformações, mediantes aos processos putrefativos, gerando uma série de contaminantes que podem ser carreados do solo para aquíferos subterrâneos (OLIVEIRA et al., 2012). Dentre esses compostos, se encontram as aminas biogênicas (STUART, 2013).

Instalações inadequadas, mal gerenciamento e ausência de tratamento dos efluentes ou produtos liberados (necrochorume) durante o processo de decomposição cadavérica, que acontecem nas necrópoles, acentuam ainda mais os riscos inerentes a esses ambientes (NECKEL et al., 2017).

5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DAS AMINAS BIOGÊNICAS E SEUS RISCOS À SAÚDE HUMANA

As aminas biogênicas são compostos orgânicos que podem estar presentes em alimentos. Esse tipo de contaminação tem despertado muita preocupação e interesse de estudo, devido ao seu alto potencial tóxico das aminas. Contudo, os dados sobre o limiar de toxicidade das aminas biogênicas para a espécie humana ainda são escassos e inconsistentes devido à complexa relação existente entre esses químicos e os indivíduos, uma vez que a dose considerada tóxica está fortemente atrelada aos mecanismos de desintoxicação de cada pessoa (ONAL, 2007).

5.1 Histamina

A histamina é uma amina biogênica formada pela descarboxilação do aminoácido L-histidina, pela enzima histidina-descarboxilase, quando as condições de manuseio e estocagem são inadequadas, favorecendo a multiplicação de microrganismos descarboxilase positivos (CARMO et al., 2010). Essa amina tem um papel fundamental no nosso organismo, pois regula um grande número de funções fisiológicas de todos os órgãos e tecidos. Apresenta um papel essencial no sistema nervoso central (SNC), como neurotransmissor e neuromodulador (COMAS-BASTÉ et al., 2020); atua em processos inflamatórios; anafilaxia; processos alérgicos; em determinados tipos de reações à droga; e

regula a secreção gástrica (OBRINK, 1991; MORRIS, 1992; MITSUHASHI; PAYAN, 1992).

O relatório da European Food Safety Authority (EFSA, 2011) alerta que os níveis de aminas biogênicas encontrados em alimentos comercializados podem representar um risco para a saúde do consumidor. Dentre as aminas biogênicas consideradas de alta toxicidade, a histamina e a tiramina se destacam como as mais tóxicas (SWIDER et al., 2020), o que as tornam, portanto, de grande interesse para investigação de segurança alimentar (COMAS-BASTÉ et al., 2020).

A histamina é a principal amina envolvida em intoxicações relacionadas ao consumo de peixes, em especial das famílias Scombridae e Scomberesocidae, sendo considerada a principal responsável pelo chamado "envenenamento por escombrídeo". Estes peixes possuem um nível elevado do aminoácido histidina, o aminoácido livre precursor da histamina, em seu tecido muscular (EFSA, 2011). Os sintomas mais comuns que caracterizam o envenenamento por histamina estão relacionados a diferentes sistemas (gastrointestinal, respiratório e vascular) e desencadeiam um quadro de erupções cutâneas, rubor, urticária, baixa pressão arterial e cefaleias (LADERO et al., 2010a; VISCIANO et al., 2014; COSTA et al., 2018).

A histamina é uma amina biogênica que tem sido muito estudada nos últimos anos, quanto a sua relação com processos crônicos. Por ser um mediador de distúrbios alérgicos, o consumo dessa amina pode levar ao mesmo efeito. Como existem similaridades entre os sintomas de uma possível alergia alimentar aos de envenenamento por histamina, o diagnóstico médico pode ser induzido ao erro (PRESTER, 2011; SWIDER et al., 2020).

Embora a presença de aminas biogênicas em alimentos seja um indicador de risco à saúde humana, as leis que estabelecem seus limites máximos de consumo ainda continuam incipientes (DEL RIO et al., 2017). Para a histamina, somente foi estabelecido pela EFSA (2011) o limite máximo para o consumo de peixes. O limite estabelecido para peixes do grupo dos escombrídeos foi estabelecido em 200 mg/kg, enquanto para outros produtos, como molho de peixe, o limite máximo corresponde a 400 mg/kg. A Food and Drug Asministration (FDA) sugere que a concentração de 500 mg/kg de histamina em peixes já apresenta uma ameaça, em potencial, à saúde humana (FDA, 1996; 2001).

Diante dos riscos potenciais da histamina, outros países também estabeleceram limites legais para o consumo dessa amina em alimentos. Na Austrália (AUSTRALIAN

FOOD STANDARDS CODE, 2001), o limite para consumo humano foi determinado em 20 mg/100 g. Na África do Sul (SOUTH AFRICAN BUREAU OF STANDARDS, 2001) e no Brasil (BRASIL, 2007), foi estipulado o consumo de 10 mg/100 g. A especificação destes limites são de extrema importância para a saúde do consumidor, pois pode prevenir o consumo abusivo de alimentos impróprios e possíveis casos de intoxicação (COSTA et al., 2018).

5.2 Tiramina

A tiramina é uma amina primária obtida pela descarboxilação do aminoácido tirosina. Essa amina é um inibidor da colinesterase, um neurotransmissor de sistemas nervosos de vertebrados e de alguns invertebrados, além de atuar na liberação de catecolaminas. É um composto simpatomimético indireto que, embora não ative receptores adrenérgicos, pode ser substrato para sistemas de captação adrenérgicas e da monoamina oxidase (MAO), enzima responsável pela degradação da tiramina (CHEBI, 2020).

Essa amina é encontrada em bebidas e alimentos fermentados, como queijo e vinho. Alimentos com altas concentrações de tiramina, mais especificamente o queijo, podem, quando consumidos, provocar a intoxicação conhecida como “Reação do queijo” (PEGG, 2013; BENKERROUM, 2016). Entretanto, altos níveis de tiramina também foram identificados em outros alimentos, como carnes e seus derivados. Os sintomas típicos de intoxicação por essa amina biogênica envolvem cefaleias e enxaqueca, problemas gastrointestinais, taquicardia e elevação do açúcar no sangue. A tiramina também promove um aumento da pressão arterial, pois está ligada a ejeção de noradrenalina do sistema nervoso simpático (BARDÓCZ, 1995; ZAMAN et al., 2009; KALAC, 2014).

De acordo com as recomendações propostas pela EFSA, a ingestão diária de tiramina não deve ultrapassar 800 mg/kg. Já o valor considerado tóxico para esta amina nos alimentos, equivale a 1080 mg/kg (EFSA, 2011).

Estudos sobre os efeitos sinérgicos da histamina e tiramina, realizados por del Rio et al. (2017) com linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano, mostraram que essa interação foi citotóxica para essas células. Os resultados mostraram que a histamina, em concentrações abaixo do limite mínimo proposto, aumentou a toxicidade da tiramina, mesmo em concentrações possíveis de serem encontradas em alimentos. Linares et al. (2016) também avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de tiramina e histamina e concluíram que

ambas as aminas são tóxicas para células intestinais, nas concentrações encontradas em alimentos. Entretanto, os modos de ação destas aminas foram distintos, pois a tiramina causou a necrose das células, enquanto a histamina induziu a apoptose celular.

5.3 Cadaverina e Putrescina

Entre as aminas biogênicas derivadas da decomposição de tecidos biológicos, encontra-se a diamina alifática cadaverina, que é produzida pela descarboxilação do aminoácido lisina, pela enzima lisina descarboxilase (HAWEL et al., 1994). Em concentrações fisiológicas, essa diamina participa de diversos processos celulares, como crescimento celular, divisão celular, transcrição, tradução e processos de morte celular. As cargas positivas dessa amina permitem ainda uma interação com ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, afetando a estabilidade dessas moléculas (HASSAIN et al., 2011).

A putrescina é uma poliamina formada a partir do aminoácido ornitina, por uma reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase. A ornitina, por sua vez, é originada da clivagem do aminoácido arginina, por uma reação catalisada pela arginase (MORGAN, 1998). A putrescina é uma amina muito importante nos processos fisiológicos por se tratar de uma molécula precursora de outras duas poliaminas, a espermidina e a espermina, ambas importantíssimas no processo de proliferação celular (SVENSSON, 2012).

A cadaverina e a putrescina são aminas biogênicas frequentemente relacionadas à sua toxicidade indireta, pois ambas atuam como potencializadores dos efeitos tóxicos da histamina (SANTOS, 1996; SHALABY, 1996; RAUSCHER-GABERNIG et al., 2012). Esta ação potencializadora ocorre por meio da inibição competitiva das enzimas desintoxicantes, diamina oxidase e histamina N-metiltransferase, presentes no processo de catabolismo oxidativo da histamina (STRATTON; HUTKINS; TAYLOR, 1991; BULUSHI et al., 2009). A potencialização do efeito tóxico da histamina, pela ação de cadaverina e putrescina, também pode ser explicada pelo fato destas aminas facilitarem a passagem da histamina pelo intestino delgado, expandindo sua taxa de absorção na corrente sanguínea (PAIK JUNG; BJELDANES, 1979; CHU; BJELDANES, 1981).

Informações sobre o potencial tóxico de cadaverina e putrescina ainda são escassas. Não há estudos disponíveis que avaliem a relação dose-resposta em humanos. Em contrapartida, Til et al. (1997) estabeleceram o Nível sem Efeitos Adversos Observado (NOAEL) para cadaverina e putrescina em ratos Wistar, corresponde a 180 mg/kg de peso

corporal/dia. Estudos realizados por Del Rio et al. (2019) avaliaram, em cultura de células intestinais, a citotoxicidade da putrescina e cadaverina. Os resultados do estudo demonstraram que ambas as aminas foram citotóxicas em concentrações encontradas em alimentos, embora o limiar de toxicidade para a cadaverina fosse o dobro da putrescina. Foram observadas também indução de necrose celular para essas aminas.

Embora os efeitos farmacológicos da cadaverina e putrescina pareçam menos nocivos do que os da histamina e tiramina, o consumo destas diaminas tem sido relacionado a diversos sintomas, dentre eles, débito cardíaco, paresia das extremidades, dilatação vascular, hipotensão e bradicardia (LADERO et al., 2010b; EFSA, 2011; DEL RIO et al., 2019).

5.4 Agmatina

A poliamina agmatina é sintetizada a partir de seu precursor L-arginina, pela ação da enzima arginina descarboxilase mitocondrial (ADC) (LI et al., 1994; 1995). Essa poliamina é conhecida há muito tempo pela sua presença em bactérias e plantas, mas, recentemente foi detectada em concentrações muito baixas em todos os tecidos animais estudados (GRILLO; COMBATO, 2004). A agmatina funciona como neurotransmissor clássico, podendo assim ser enquadrada como um novo neurotransmissor/ neuromodulador no Sistema Nervoso Central (SNC), pois possui uma enzima responsável por sua síntese e outra pela sua degradação; é armazenada em vesículas e liberada mediante exocitose dependente de cálcio (REIS; REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001).

A agmatina pode ser encontrada principalmente em alimentos fermentados, em concentrações que podem variar de 5,5 mg/kg (pasta de soja) a 7,9 mg/kg (alguns produtos cárneos processados) (HERNÁNDEZ-JOVER et al., 1997; SHUKLA et al, 2010). Apesar de não estar relacionada diretamente com efeitos tóxicos (LAUBE; BERNSTEIN, 2017; KRALJ CIGIĆ et al., 2020), a agmatina pode estar envolvida na formação da putrescina, amina biogênica conhecida pela sua toxicidade. Neste caso, a putrescina pode se originar por meio de outra via bioquímica, pelo processo de desaminação da agmatina, envolvendo duas principais enzimas: agmatina desaminase e putrescina carbamoiltransferase (LU et al., 2002, LANDETE et al., 2008).

Estudos relataram que o microrganismo *Lactobacillus hilgardii* X1B, isolado de vinho, é capaz de produzir putrescina a partir da arginina. Nesta cepa, a formação de putrescina a partir da arginina, envolve a formação da agmatina e ornitina. De acordo com a formação de metabólitos da arginina, os resultados dos estudos apontam que a agmatina pode contribuir para a produção da putrescina (ARENA; MANDA DE NADRA, 2001; ARENA et al., 2007).

5.5 Espermina e Espermidina

A poliamina espermidina é uma amina biogênia derivada da monoalquilação da putrescina. A alquilação da espermidina gera a espermina. Tanto a espermidina quanto a espermina são aminas importantíssimas no processo de proliferação celular (MORGAN et al., 1998). A via de transformação dessas aminas inicia-se pela descarboxilação da ornitina, pela ornitina descarboxilase (ODC), gerando a putrescina. Posteriormente, dois grupos aminopropil são adicionados a putrescina. A primeira adição do grupo aminopropil, que é catalisada pela espermidina sintase, dá origem a espermidina e a segunda adição, pela espermina sintase, levando à formação da espermina (WALLACE, 2009).

As aminas biogênicas espermina e espermidina são encontradas tanto em alimentos de origem vegetal como animal. Os peixes processados são alguns dos alimentos mais ricos em espermina e espermidina, assim como alguns legumes (soja e feijão), frutas (maracujá), mariscos, produtos cárneos e queijos (ELIASSEN et al., 2002; KALAC, 2014).

Apesar dessas poliaminas serem importante para alguns processos fisiológicos, elas também podem desencadear efeitos adversos, como alguns tipos de toxicidade. Em experimento realizado com ratos Wistar, a administração de espermina e espermidina causou reduções consideráveis na pressão arterial, alteração na atividade respiratória e também, nefrotoxicidade (TIL et al., 1997; PEGG, 2013). Estudos realizados por del Rio et al. (2018), com cultura de células intestinais humanas, mostraram que ambas as aminas (espermina e espermidina) induziram necrose celular, confirmando um efeito citotóxico para elas. Tanto para espermina como para espermidina, suas concentrações consideradas tóxicas estavam acima das encontradas em alimentos.

5.6 Triptamina e Feniletilamina

A triptamina é uma monoamina da classe dos alcalóides derivada da descarboxilação do aminoácido triptofano (MURCH et al., 2001), pela enzima aminoácido aromático desidrogenase (AADC). Sua importância como neurotransmissor e neuromodulador é bem conhecida, por causa de sua presença no cérebro de mamíferos, em quantidades vestigiais de aproximadamente 3,5 mol/g (JONES, 1982; MAHMOOD et al. 2010). Para produzir fenômenos psicotrópicos, é necessária uma pequena quantidade de triptamina, devido a ação que essa amina promove no SNC (JACOB; PRESTI, 2005)

A triptamina também apresenta toxicidade conhecida em alimentos, sendo encontrada, em maior quantidade, em salsichas e produtos cárneos. Os efeitos nocivos da sua ingestão são semelhantes aos da tiramina (vasoconstrição, aumento da pressão arterial, cefaleias, vômito, febre e transpiração) (EDWARDS; SANDINE, 1981; CHANG; AYRES; SANDINE, 1985; ANWAR et al., 2013; WÜST et al., 2017).

A EFSA (2011) sinaliza que a triptamina pode ser encontrada em concentrações elevadas em molhos de peixes, atingindo até 2280 mg/kg, e em outros produtos também derivados de peixe, que podem conter até 362 mg/kg. Laticínios, como queijo, podem apresentar até 312 mg/kg, e alguns produtos cárneos fermentados, como salsichas, até 194 mg/kg.

A feniletilamina é uma aralquilamina, da classe dos alcalóides, produzida a partir do aminoácido L-fenilalanina, pela ação da enzima L-aminoácido descarboxilase aromática. Essa amina age, em humanos, como estimulante do SNC. A presença de feniletilamina, assim como da triptamina, nos alimentos é considerada preocupante. Em produtos fermentados, como a salsicha, podem ser encontrada altas concentrações dessa amina (até a 182 mg/kg). Em peixes e seus derivados, os níveis desta amina podem chegar a 172 mg/kg; em bebidas alcoólicas, como a cerveja, foram registrados níveis de até 8,4 mg/kg e em vegetais de 9,3 mg/kg. Esta amina também é encontrada em queijos, podendo chegar a concentração de 61 mg/kg (EFSA, 2011)

As aminas triptamina e feniletilamina também podem atuar na inibição de enzimas desintoxicantes da histamina, provocando um aumento de sua toxicidade. Enquanto a feniletilamina inibe a diamina oxidase (DAO) e histamina N-metiltransferase (HNMT), a triptamina inibe apenas a DAO (STRATTON; HUTKINS; TAYLOR, 1991).

Del Rio et al. (2020) avaliaram, em linhagem de células epiteliais intestinais humanas, a toxicidade da triptamina e da feniletilamina. Os resultados mostraram que ambas as aminas biogênicas induziram morte celular, mas por processos diferentes. A feniletilamina induziu morte por necrose e a triptamina por apoptose. Contudo, somente a triptamina induziu ação citotóxica para concentrações passíveis de serem encontradas em alimentos.

6 NITROSAMINAS

As nitosaminas, compostos considerados potencialmente carcinogênicos, constituem ainda um outro risco toxicológico associado às aminas biogênicas, principalmente relacionados com as aminas cadaverina e putrescina. Este risco é ainda maior em produtos cárneos com altos níveis de aminas biogênicas e de sais de nitrito ou nitrato, utilizados como conservantes. Outro fator importante a ser considerado é que, quando esses produtos são aquecidos, pode-se elevar ainda mais o seus riscos, pois as altas temperaturas podem favorecer a interação entre as aminas biogênicas e os compostos nitrogenados, originando as nitrosaminas (BULUSHI et al., 2009; DE MEY et al., 2014; RUIZ-CAPILLAS; HERRERO, 2019).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou 24 tipos de N-nitrosaminas, quanto ao seu potencial carcinogenético para humanos. Dois destes tipos estão classificados como cancerígenos humanos conhecidos e o restante foi dividido entre as categorias de provavelmente cancerígenos e possivelmente cancerígenos (IARC, 2015).

As aminas primárias, como a putrescina e a cadaverina, são convertidas, durante o aquecimento, em aminas secundárias como pirrolidina e piperidina, que, por sua vez, reagem com nitrito, dando origem a nitrosaminas cancerígenas (Lijinsky e Epstein, 1970). O envolvimento de aminas biogênicas no processo de formação de nitrosaminas foi corroborado pelo estudo de Wartthesen et al. (1975). Os autores demonstraram, por testes *in vitro*, que após o tratamento com nitrito, as aminas putrescina e a cadaverina produziram as aminas secundárias nitrosopirrolidina e nitrosopiperidina, respectivamente.

Embora os estudos realizados em humanos sobre a relação entre a ingestão de nitrato e nitrito e o risco de câncer sejam inconsistentes, existem evidências que relacionam a digestão desses compostos a um maior risco relativo (acima de 1) da ocorrência de câncer.

Essas evidências se baseiam no potencial de reação (vias endógenas ou mesmo no processamento de alimentos) com outros compostos, que levam a produção de carcinógenos, como as nitrosaminas (KARWOWSKA; KONONIUK, 2020).

Dentre os tipos de câncer citados, se destacam o carcinoma de células renais (YANG et al., 2017), câncer gástrico (YANG et al. 1997; KIM et al., 2007), câncer colorretal (DELLAVALLE et al., 2014), câncer de mama (ESPEJO-HERRERA et al., 2016) e câncer de tireoide (WARD et al., 2010). Contudo, em circunstâncias normais, o corpo humano possui um sistema de desintoxicação, principalmente no intestino, que atua sobre as aminas biogênicas, por meio da ação de enzimas específicas como a monoamina oxidase (MAO), diamina oxidase (DAO), poliamina oxidase (PAO) e histamina N-metiltransferase (HNMT) (SANTOS, 1996; NOVAK, 2007; MAINTZ; SCHWELBERGER; FEURLE; HOUEN, 2017; ERDAG; MERHAN; YILDIZ, 2019).

7 APLICAÇÃO, DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

7.1 Marcadores de qualidade de alimentos

A detecção de aminas biogênicas em alimentos é de extrema importância, não só do ponto de vista toxicológico, mas também como um parâmetro de identificação de qualidade alimentar, pois, essa avaliação pode-se inferir o grau de frescor ou de deterioração dos alimentos. Pelas dificuldades de se determinar e quantificar estas aminas nos alimentos, temos, até o momento, dados insuficientes sobre a ocorrência desses compostos em diferentes tipos de alimentos e bebidas. Tais problemas estão relacionados à interferência da matriz, como a presença de aminoácidos livres, e aos baixos níveis em que essas aminas são encontradas (ALBERTO; ARENA; NADRA, 2002).

A análise quantitativa de aminas biogênicas em amostras de alimentos tem sido feito por meio de diversas metodologias analíticas (VERMA et al., 2020). Dentre as mais utilizadas estão a de cromatografia em camada delgada - TLC (LAPA-GUIMARÃES; PICKOVA, 2004; XIE et al., 2017); eletroforese capilar - CE (KOVÁCS; SIMON-SARKADI; GANZLER, 1999; ADIMCILAR; ÖZTEKIN; BEDIA ERIM, 2017); cromatografia gasosa - GC (ALMEIDA; FERNANDES; CUNHA, 2012; WOJNOWSKI; NAMIEŚNIK; PŁOTKA-WASYLKA, 2019) e cromatografia líquida de alta performance – HPLC (HWANG et al., 1997; DONG; XIAO, 2017).

Ainda que os métodos referenciados sejam amplamente utilizados, existem desvantagens em sua aplicação, como, por exemplo, a utilização de equipamentos caros e a necessidade de uma equipe especializada para manipulá-los e para aplicar as técnicas de maneira efetiva, para a aquisição de resultados confiáveis nas mais variadas amostras. Devido a estes fatores, muitos estudos realizados nos últimos anos tem recorrido ao uso de biossensores, como alternativa para a detecção de aminas biogênicas, pois são considerados dispositivos sensíveis, de simples e rápida execução, além de serem de baixo custo e econômica (VERMA et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2021).

Os biossensores são baseados no princípio da interação entre elementos biológicos e um determinado analito (substância a ser detectada na amostra) e na geração de alterações físico-químicas, como transferência de elétrons ou calor, mudança do pH e massa, absorção ou liberação de íons ou gases específicos. Basicamente, os biossensores, formados por anticorpos, ácidos nucléicos ou enzimas, desempenham a função de biorreconhecimento, (CHAUBEY; MALHORTRA, 2002).

7.2 Marcadores de processo de decomposição

Para possibilitar um melhor entendimento dos processos químicos envolvidos na putrefação de corpos é necessário identificar e quantificar os compostos presentes no líquido gerado durante a decomposição (necrochorume). Contudo, essa avaliação não é uma tarefa fácil, pois o necrochorume é uma amostra química de alta complexidade (SWANN; FORBES; LEWIS, 2010).

Os produtos da degradação de proteínas (aminas biogênicas), também presentes neste líquido, têm sido estudados sob diversos aspectos relacionados com os processos tafonômicos de restos mortais humanos. A putrescina e cadaverina são exemplos de aminas biogênicas que foram previamente investigadas em tecidos humanos (PACZKOWSKI; SCHÜTZ, 2011).

Os estudos de Hoffman et al. (2009) sugeriram que a detecção de aminas por cães farejadores treinados pode contribuir para a localização de sepultamentos clandestinos e restos mortais. A certificação e obtenção dos compostos da putrefação foram feitas pela metodologia analítica de micro-extração por fase sólida (SPME), acoplada a cromatografia gasosa/ espectrometria de massa (GC-MS) (HOFFMAN et al., 2009). Vass et al. (2002)

analisaram, por GC-MS, a presença de cadaverina e putrescina em tecidos, para a estimar o intervalo pós morte (IPM), porém o estudo revelou inconsistência nas concentrações destas aminas entre os cadáveres.

Apesar de serem consideradas importantes marcadores de decomposição cadavérica, a cadaverina e putrescina não são frequentemente reportadas na literatura, devido à sua baixa volatilidade (BALTA et al., 2020). Porém, em um estudo elaborado por Pelleti et al. (2019) com GC-MS, os autores validaram, pela primeira vez, a utilização de cadaverina e putrescina como marcadores de intervalo pós-morte (IPM).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de aminas biogênicas em alimentos é uma causa bastante comum de intoxicação. Por esse motivo, a realização de estudos que permitam um melhor conhecimento desses compostos, em relação aos seus efeitos toxicológicos, condições para sua formação, metodologias de detecção e quantificação mais sensíveis, se tornam de extrema pertinência. As informações obtidas nesses estudos podem dar um maior suporte aos órgãos competentes, no estabelecimento de legislações mais consistentes e rígidas, que assegurem a qualidade alimentar e, consequentemente, a saúde do consumidor.

Mais estudos também são necessários para o melhor entendimento do modo de ação das aminas presentes no necrochorume, uma vez que a composição química deste líquido é bastante complexa. Existe ainda a necessidade de validar metodologias analíticas mais efetivas, para uma melhor caracterização das substâncias originadas no processo de decomposição de corpos, uma vez que esses dados servirão para aprimorar técnicas que permitam a utilização destas aminas como marcadores de decomposição. Essas técnicas também poderão auxiliar os estudos de impactos ambientais promovidos pelos produtos gerados na decomposição cadavérica, comuns de ambientes de cemitérios, bem como alertar para as possíveis consequências desta contaminação para a saúde humana.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIMCILAR, V.; ÖZTEKIN, N.; BEDIA ERIM, F. A direct and sensitive analysis method for biogenic amines in dairy products by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. **Food Analytcal Methods**, v. 11, n. 5, p. 1374–1379, 2017.

AHMAD, W.; MOHAMMED, G. I.; AL-ERYANI, D. A.; SAIGL, Z. M.; ALYOUBI, A. O.; ALWAEL, H.; BASHAMMAKH, A. S.; O'SULLIVAN, C. K.; EL-SHAHAWI, M. S. Biogenic amines formation mechanism and determination strategies: future challenges and limitations. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 485–500, 2020.

AL BULUSHI, I.; POOLE, S.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage and nitrosamine formation - A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 4, p. 369–377, 2009.

ALBERTO, R.; ARENA, M. E.; NADRA, C. M. DE. A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. **Food Control**, v. 13, p. 125–129, 2002.

ALMEIDA, C.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. A novel dispersive liquid e liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC e MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. **Food Control**, v. 25, p. 380–388, 2012.

ANWAR, M. A.; FORD, W. R.; HERBERT, A. A.; BROADLEY, K. J. Signal transduction and modulating pathways in tryptamine-evoked vasopressor responses of the rat isolated perfused mesenteric bed. **Vascular Pharmacology**, v. 58, p. 140–149, 2013.

ARENA, M. E.; LANDETE, J. M.; MANCA DE NADRA, M. C.; PARDO, I.; FERRER, S. Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X1B isolated from wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 158–165, 2007.

ARENA, M. E.; MANCA DE NADRA, M. C. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 158–162, 2001.

AUSTRALIAN FOOD STANDARDS CODE. PART D: **Fish and Fish Products**. Standards D1 and D2. Version 18, 2001.

BALTA, J. Y.; BLOM, G.; DAVIDSON, A.; PERRAULTD, K.; CRYANA, J. F. ; O'MAHONYA, S. M.; CASSELLA, J. P. Developing a quantitative method to assess the decomposition of embalmed human cadavers. **Forensic Chemistry**, v. 18, p. 1–6, 2020.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 341–346, 1995.

BENKERROUM, N. Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 801–826, 2016.

BOVER-CID, S.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C. Processing contaminants. **Encyclopedia of Food Safety**, v. 2, p. 381–391, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n° 185, de 13 de maio de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Diário Oficial da União. Brasília, DF, 1997.

CARMO, F. B. T.; MÁRSICO, E. T.; CLEMENTE, S. C. S.; CARMO, R. P.; FREITAS, M. Q. Histamina em conservas de sardinha. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.174-180, 2010.

CASERO, R. A.; MARTON, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 373-390, 2007.

CHANG, S.-F.; AYRES, J. W.; SANDINE, W. E. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophane. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2840–2846, 1985.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 17, n. 6–7, p. 441–456, 2002.

CHEMICAL ENTITIES OF BIOLOGICAL INTEREST (ChEBI). CHEBI: 15760-tyramine, 2020. Disponível em: https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:15760. Acesso em: 06 jun. 2021.

CHU, C.; BJELDANES, L. Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin *in vitro*. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 1, p. 79–80, 1981.

COSTA, M. P.; RODRIGUES, B. L.; FRASAO, B. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. Biogenic amines as food quality index and chemical risk for human consumption. In: HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. **Food Quality: Balancing Health and Disease**. Academic Press, 2018. cap 2, p. 75–108.

COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test : responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 429–453, 2003.

DELLAVALLE, C. T.; XIAO, Q.; YANG, G.; SHU, X. O.; ASCHEBROOK-KILFOY, B.; ZHENG, W.; GAO, Y. T. Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai Women's Health Study. **International Journal of Cancer**, n. 134, p. 2917–2926, 2014.

DE MEY, E.; DE KLERCK, K.; DE MAERE, H.; DEWULF, L.; DERDELINCKY, M. C. P.; FRAYE, I. The occurrence of N -nitrosamines , residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. **Meat Science**, v. 96, p. 821–828, 2014.

DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; LINARES D. M.; LADERO, V.; FERNANDEZ, M.; MARTIN, M. C.; RUAS-MADIEDO, P.; ALVAREZ, M. A. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. **Food Chemistry**, v. 218, p. 249–255, 2017.

DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; LINARES D. M.; LADERO, V.; RUAS-MADIEDO, P.; FERNANDEZ, M.; MARTIN, M. C.; ALVAREZ, M. A. Spermine and spermidine are cytotoxic towards intestinal cell cultures , but are they a health hazard at concentrations found in foods? **Food Chemistry**, v. 269, p. 321–326, 2018.

DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; LINARES D. M.; LADERO, V.; RUAS-MADIEDO, P.; FERNANDEZ, M.; MARTIN, M. C.; ALVAREZ, M. A. The biogenic amines putrescine and cadaverine show *in vitro* cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, v. 9, n. 120, p. 1–7, 2019.

DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; FERNANDEZ, M.; MARTIN, M. C.; LADERO, V.; ALVAREZ, M. A. The biogenic amine tryptamine, unlike β-phenylethylamine, shows *in vitro* cytotoxicity at concentrations that have been found in foods. **Food Chemistry**, v. 331, 127303, 2020.

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

DONG, H.; XIAO, K. Modified QuEChERS combined with ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce. **Food Chemistry**, v. 229, p. 502–508, 2017.

EDWARDS, S.; SANDINE, W. Public health significance of amines in cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 2431–2438, 1981.

EKICI, K.; OMER, A. K. Biogenic amines formation and their importance in fermented foods. **BIO Web of Conferences**, v. 232, n. 17, p. 1–5, 2020.

ELIASSEN, K. A.; REISTAD, R.; RISØEN, U.; RØNNING, H. F. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, v. 78, p. 273–280, 2002.

ERDAG, D.; MERHAN, O.; YILDIZ, B. Biochemical and pharmacological properties of piogenic amines. In: PROESTOS, C. **Biogenic Amines**. IntechOpen, 2019. p. 1–14.

ESPEJO-HERRERA, N.; GRACIA-LAVEDAN, E.; POLLAN, M.; ARAGONÉS, N.; BOLDO, E.; PEREZ-GOMEZ, B.; ALTZIBA, R. J. M.; AMIANO, P.; ZABALA, A. J.; ARDANAZ, E.; GUEVARA, M.; MOLINA, A. J.; BARRIO, J. P.; GÓMEZ-ACEBO, I.; TARDÓN, A.; PEIRÓ, R.; CHIRLAQUE, M. D.; PALAU, M.; MUÑOZ, M.; FONT-RIBERA, L.; CASTAÑO-VINYALS, G.; KOGEVINAS, M.; VILLANUEVA, C. M. Ingested nitrate and breast cancer in the Spanish multicase-control study on cancer (MCC-Spain). **Environmental Health Perspectives**, v. 12, p. 1042– 1049, 2016.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, p. 1–93, 2011.

FEDDERN, V.; MAZZUCO, H.; FONSECA, F. M. DA; LIMA, G. J. M. M. DE. A review on biogenic amines in food and feed: toxicological aspects, impact on health and control measures. **Animal Production Science**, v. 59, n. 4, p. 608–618, 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Decomposition and histamine in raw, frozen tuna and mahi-mahi canned tuna; and related species. **Compliance Policy Guides**, p. 540-625, 1996.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Scombro toxin (histamine) formation. In: **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide**. Washington, DC: P. H. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, 2001.

FORBES, S.L. Decomposition Chemistry. In TIBBETT, M., CARTER, D. **Soil Analysis in Forensic Taphonomy**. New York: CRC Press, 2008, p. 203-238.

GALLOWAY, A.; BIRKBY, W. H.; JONES, A. M.; HENRY, T. E.; PARKS, B. O. Decay rates of human remains in an arid environment. **Journal of Forensic Sciences**, v. 34, p. 607-616, 1989.

GILL-KING, H. Chemical and ultrastructural aspects of decomposition. In: HAGLUND, W.D.; SORG, M. H. **Forensic Taphonomy**. Boca Raton: CRC Press, 1999, p. 93–108.

GOFF, M. L. Early *post mortem* changes and stages of decomposition in exposed cadavers. **Experimental and Applied Acarology**, v. 49, p. 21–36, 2009.

GRILLO, M. A.; COLOMBATTO, S. Metabolism and function in animal tissues of agmatine, a biogenic amine formed from arginine. **Amino Acids**, v. 26, p. 3-8, 2004.

HAU, T. C.; HAMZAH, N. H.; LIAN, H. H.; HAMZAH, S. P. A. A. Decomposition process and *post mortem* changes : review. **Sains Malaysiana**, v. 43, n. 12, p. 1873–1882, 2014.

HAWEL, L. III.; TJANDRAWINATA, R. R.; FUKUMOTO, G. H.; BYUS C.V. Biosynthesis and selective export of 1,5-diaminopentane (cadaverine) in mycoplasma-free cultured mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 269, p. 7412-7418, 1994.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUES, M.T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2098-2102, 1997.

HOFFMAN, E. M.; CURRAN, A. M.; DULGERIAN, N.; STOCKHAM, R. A.; ECKENRODE, B. A. Characterization of the volatile organic compounds present in the headspace of decomposing human remains. **Forensic Science International**, v. 186, n. 1-3, p. 6–13, 2009.

HUSSAIN, S.; ALI, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUE, K. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 300-311, 2011.

HWANG, D. F.; CHANG, S. H.; SHIUA, C. Y.; CHAI, T. J. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. **Journal of Chromatography B**, v. 693, p. 23–30, 1997.

IDEHEN, O.; EZENWA, I. Influence of Third Cemetery Location on the Quality of Domestic and Groundwater Resources in Benin City, Nigeria. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 23, n. 1, p. 5, 2019.

INTERNATION AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Monographs on the Evaluation of 726 Carcinogenic Risks to Humans. in: **World Health Organization - WHO**, 2015.

IOAN, B. G.; MANEA, C.; HANGANU, B.; STATESCU, L.; SOLOVASTRU, L. G.; MANOILESCU, I. The chemistry decomposition in human corpses. Revista de Chimie, v. 68, n. 6, p. 1450–1454, 2017.

KALAC, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines : a review for the period 2005-mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27–39, 2014.

KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. **Chemical papers**, v. 59, n. 1, p. 70–79, 2005.

KARWOWSKA, M.; KONONIUK, A. Nitrates/Nitrites in Food - Risk for Nitrosative Stress and Benefits. Antioxidants, v. 9, n. 3, p. 241-257, 2020.

KEMERICH, P. D. C.; BORBA, W. F.; GRAEPIN, C.; BARROS, G.; GERHARDT, A. E. Alterações químicas em solo ocupado por cemitério horizontal no norte do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 3, p. 85-99, 2014.

KIM, H. J.; LEE, S. S.; CHOI, B. Y.; KIM, M. K. Nitrate intake relative to antioxidant vitamin intake affects gastric cancer risk: A case-control study in Korea. **Nutrition and Cancer**, n. 59, p. 185–191, 2007.

KOVÁCS, Á.; SIMON-SARKADI, L.; GANZLER, K. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 836, p. 305–313, 1999.

KRALJ CIGIĆ, I.; RUPNIK, S.; RIJAVEC, T.; POKLAR ULRIH, N.; CIGIĆ, B. Accumulation of agmatine, spermidine, and spermine in sprouts and microgreens of alfalfa, fenugreek, lentil, and daikon radish. **Foods**, v. 9, n. 5, p. 1-20, 2020.

KULEY, E.; BALIKCI, E.; ÖZOĞUL, I.; GÖKDOGAN, S.; OZOĞUL, F. Stimulation of cadaverine production by foodborne pathogens in the presence of *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus spp*. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 12, p. 650–658, 2012.

LADERO, V.; CALLES-ENRIQUEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, p. 145–156, 2010b.

LADERO, V.; MARTÍNEZ, N.; MARTÍN, M. C.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 289–295, 2010a.

LANDETE, J. M.; ARENA, M. E.; PARDO, I.; MANCA DE NADRA, M. C.; FERRER, S. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. **Food Microbiology**, v. 25, n. 7, p. 882–887, 2008.

LAPA-GUIMARÃES, J.; PICKOVA, J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 223–232, 2004.

LARQUÉ, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. **Nutrition**, v. 23, p. 87-95, 2007.

LAUBE, G.; BERNSTEIN, H.-G. Agmatine: multifunctional arginine metabolite and magic bullet in clinical neuroscience? **Biochemical Journal**, v. 474, n. 15, p. 2619-2640, 2017.

LI, G.; REGUNATHAN S.; BARROW, C. J.; ESHRAGHI, J.; COOPER, R.; REIS, D. J. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. **Science**, v. 263, p. 966-969, 1994.

LI, G.; REGUNATHAN S.; REIS, D. J. Agmatine is synthesized by a mitochondrial arginine decarboxylase in rat brain. **New York Academy of Sciences**, v. 763, p. 325-329, 1995.

LIJINSKY, W.; EPSTEIN, S. Nitrosamines as environmental carcinogens. **Nature**, v. 225, p. 21–23, 1970.

LINARES, D. M.; DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; LADERO, V.; MARTIN, M. C.; FERNANDEZ, M.; RUAS-MADIEDO, P.; ALVAREZ M. A. Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. **Food Chemistry**, v. 197, p. 658–663, 2016.

LORENZO, J. M.; FRANCO, D.; CARBALLO, J. Biogenic amines in fermented meat products. In: ZDOLEC, N. **Fermented Meat Products:** Health Aspects. Boca Raton, CRC Press, 2016, cap. 19, p. 450-473.

LORENZO, J. M.; MARTINEZ, S.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. **Meat Science**, v. 77, n. 2, p. 287– 93, 2007.

LU, C. D.; ITOH, Y.; NAKADA, Y.; JIANG, Y. Functional analysis and regulation of the divergent spuABCDEFGH-spuI operons for polyamines uptake and utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 3765-3773, 2002

MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. **American Society for Nutrition**, n. 85, p. 1185–1196, 2007.

MITSUHASHI, M.; PAYAN, D. G. Functional diversity of histamine and histamine receptors. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 98, n. 6, p. 8-11, 1992.

MOLDERINGS, G. J., HEINEN, A., MENZEL, S., GÖTHERT, M. Exposure of rat isolated stomach and rats *in vivo* to [14C] agmatine: accumulation in the stomach wall and distribution in various tissues. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 16, p. 219-225, 2002.

MORGAN, D. M. L. Methods in molecular biology. In: MORGAN, D. **Polyamine protocols**. Totowa: Human Press, 1998, p. 1–30.

NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P.; MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food - Existing and emerging approaches. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 139–150, 2010.

NECKEL, A.; COSTA, C.; MARIO, D. N.; SABADIN, C. E. S.; BODAH, E. T. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries : a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. **Brazilian Journal of Urban Management**, v. 9, n. 2, p. 216–230, 2017.

NOLAN, A. N.; MAKER, G.; MEAD, R. J.; BRINGANS, S.; SPEERS, S. J. Peptide analysis of mammalian decomposition fluid in relation to the *post mortem* interval. **Forensic Science International**, v. 311, 2020b.

NOLAN, A. N.; MEAD, R. J.; MAKER, G.; SPEERS, S. J. A review of the biochemical products produced during mammalian decomposition with the purpose of determining the *post mortem* interval. **Australian Journal of Forensic Sciences**, v. 52, n. 4, p. 477–488, 2020a.

NUÑEZ, M.; DEL OLMO, A.; CALZADA, J. Biogenic amines. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 416–423, 2015.

OBRINK, K.; J. Histamine and gastric acid secretion. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.26, p. 4-8, 1991.

OLIVEIRA, B.; QUINTEIRO, P.; CAETANO, C.; NADAIS, H.; ARROJA, L.; FERREIRA DA SILVA, E.; SENOS MATIAS, M. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. **Water and Environment Journal**, v. 27, n. 1, p. 99–106, 2012.

ONAL, A. A review : current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1475–1486, 2007.

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.

ÖZOGUL, F.; HAMED, I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 10, p. 1660–1670, 2018.

PACZKOWSKI, S.; SCHÜTZ, S. *Post mortem* volatiles of vertebrate tissue. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 917–935, 2011.

PAIK JUNG, H.; BJELDANES, L. Effects of cadaverine on histamine transport and metabolism in isolated gut sections of the guinea-pig. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 17, n. 6, p. 329–632, 1979.

PEGG, A. E. Toxicity of polyamines and their metabolic products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1782–1800, 2013.

PELLETTI, G.; GARAGNANI, M.; BARONE, R.; BOSCOLO-BERTO, R.; ROSSI, F.; MOROTTI, A.; ROFFI, R.; FAIS, P.; PELOTTI, S. Validation and preliminary application of a GC-MS method for the determination of putrescine and cadaverine in the human brain: a promising technique for PMI estimation. **Forensic Science International**, v. 297p. 221-227, 2019.

PINHEIRO, J. Decay process of a cadaver. In: SCHMITT, A.; CUNHA, E.; PINHEIRO, J. **Forensic Anthropology and Medicine:** Complementary Sciences From Recovery to Cause of Death. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2006, p. 85–116.

PRESTER, L. Biogenic amines in fish , fish products and shellfish : a review. **Food Additives & Contaminants**, v. 28, n. 11, p. 1547–1560, 2011.

RAASCH, W.; SCHAFER, U.; CHUN, J.; DOMINIAK, P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline biding sites. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 755-780, 2001.

RAUSCHER-GABERNIG, E.; GABERNIG, R.; BRUELLER, W.; GROSSGUT, R.; BAUER, F.; PAULSEN, P. Dietary exposure assessment of putrescine and cadaverine and derivation of tolerable levels in selected foods consumed in Austria. **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 209–220, 2012.

RÊGO, I. O.; MENEZES, L. D.; FIGUEIREDO, T. C.; OLIVEIRA, D. D.; ROCHA, J. S.; LARA, L. J.; LIMA, A. L.; SOUZA, M. R.; CANÇADO, S. V. Bioactive amines and microbiological quality in pasteurized and refrigerated liquid whole egg. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 1018–1022, 2014.

REIS, D. J.; REGUNATHAN, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 187-193, 2000

RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A. M. Impact of biogenic amines on food quality and safety. **Foods**, v. 8, n. 62, p. 1–16, 2019.

SABUCEDO, A. J.; FURTON, K. G. Estimation of *post mortem* interval using the protein marker cardiac Troponin I. **Forensic Science International**, v. 134, n. 1, p. 11–16, 2003.

SÁNCHEZ-PÉREZ, S.; COMAS-BASTÉ, O.; RABELL-GONZÁLEZ, J.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines in plant-origin foods : are they frequently underestimated in low-histamine diets? **Foods**, v. 7, n. 12, p. 1–17, 2018.

SANTOS, M. H. S. Biogenic amines : their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2-3, p. 213–231, 1996.

SCHWELBERGER, H. G.; FEURLE, J.; HOUEN, G. Mapping of the binding sites of human histamine N-methyltransferase (HNMT) monoclonal antibodies. **Inflammation Research**, v. 66, n. 11, p. 1021–1029, 2017.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675–690, 1996.

SHUKLA, S., PARK, H.-K., KIM, J.-K. AND KIM, M. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1191-1195, 2010.

SMITH, T. K.; TAPIA-SALAZAR, M.; RICQUE-MARIE, D. Feed-borne biogenic amines: natural toxicants or growth promotors? **Biogenic Amines**, v. 10, n. 8, p. 24–32, 2000.

SOUTH AFRICAN BUREAU OF STANDARDS. **Regulations Governing Microbiological Standards for Foodstuffs and Related Matters**. Government Notice, n° 490, 2001.

STADLER, S.; STEFANUTO, P. H.; BROKL, M.; FORBES, S. L.; FOCANT, J. F. Characterization of volatile organic compounds from human analogue decomposition using thermal desorption coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 998–1005, 2013.

STADNIK, J.; DOLATOWSKI, Z. J. Biogenic amines in meat and fermented meat products. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 9, n. 3, p. 251–263, 2010.

STRATTON, J. E.; HUTKINS, R. W.; TAYLOR, S. L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods : a review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 6, p. 460–470, 1991.

STUART, B. Decomposition Chemistry: Overview, Analysis, and Interpretation. In: SIEGEL, J. A.; SAUKKO, P. J. **Encyclopedia of Forensic Sciences**. 2. ed. Academic Press, 2013, p. 11-15.

SVENSSON, K, 2012. Mechanistic studies on the role of polyamines and microvesicles in tumor growth and hypoxia-mediated angiogenesis. Disponível em: https://lup.lub.lu.se/search/ws/files/4071587/2294184.pdf. Acesso em: 06 jun. 2021.

SWANN, L.; CHIDLOW, G. E.; FORBES, S.; LEWIS, S. W. Preliminary studies into the characterization of chemical markers of decomposition for geoforensics. **Journal of Forensic Science**, v. 55, n. 2, p. 308–314, 2010a.

SWANN, L.; FORBES, S.; LEWIS, S. W. Observations of the temporal variation in chemical content of decomposition fluid : A preliminary study using pigs as a model system. **Australian Journal of Forensic Sciences**, v. 42, n. 3, p. 199–210, 2010b.

ŚWIDER, O.; ROSZKO, M. Ł.; WÓJCICKI, M.; SZYMCZYK, K. Biogenic amines and free Amino Acids in traditional fermented vegetables-dietary risk evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 856–868, 2020.

TEN BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H. M. L. J.; HUIS IN 'T VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 73–84, 1990.

TIL, H. P.; FALKE, H. E.; PRINSEN, M. K.; WILLEMS, M. I. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 337–348, 1997.

VASCONCELOS, H.; COELHO, L. C. C.; MATIAS, A.; SARAIVA, C.; JORGE, P. A. S.; DE ALMEIDA, J. M. M. M. Biosensors for biogenic amines : a review. **Biosensors**, v. 11, n. 82, p. 1–21, 2021.

VASS, A. A.; BARSHICK, S. A.; SEGA, G.; CATON, J.; SKEEN, J. T.; LOVE, J. C.; SYNSTELIEN, J. A. Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the *post mortem* interval. **Journal of Forensic Sciences**, v.47, n. 3, p. 542-53, 2002.

VASS, A. A.; BASS, W. M.; WOLT, J. D.; FOSS, J. E.; AMMONS, J. T. Time since death determinations of human cadavers using soil solution. **Journal of Forensic Sciences**, v. 37, n. 5, p. 1236-1253, 1992.

VASS, A. A.; SMITH, R. R.; THOMPSON, C.V.; BURNETT, M. N.; DULGERIAN, N.; ECKENRODE, B. A. Odor analysis of decomposing buried human remains. **Journal of Forensic Sciences**, v. 53, n. 2, p. 384–391, 2008.

VERMA, N.; HOODA, V.; GAHLAUT, A.; GOTHWAL, A.; HOODA, V. Critical reviews in biotechnology enzymatic biosensors for the quantification of biogenic amines : a literature update. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, p. 1–14, 2020.

VINCI, G.; ANTONELLI, M. L. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. **Food Control**, v. 13, n. 8, p. 519–524, 2002.

VISCIANO, P.; SCHIRONE, M.; TOFALO, R.; SUZZI, G. Biogenic amines in raw and processed seafood. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–10, 2012.

VISCIANO, P.; SCHIRONE, M.; TOFALO, R.; SUZZI, G. Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–4, 2014.

WALLACE, H.M. The polyamines: past, present and future. **Biochemical Society**, v. 46, p. 1–9, 2009.

WARD M. H.; KILFOY B. A.; WEYER P. J.; ANDERSON K. E.; FOLSOM A. R.; CERHAN J. R. Nitrate intake and the risk of thyroid cancer and thyroid disease. **Epidemiology**, v. 21, n. 3, p. 389-95, 2010.

WARTHESEN, J. J.; SCANLAN, R. A.; BILLS, D. D.; LIBBEY, L. M. Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 898–902, 1975.

WISMAN, A.; SHIRIRA, I. The smell of death : evidence that putrescine elicits threat management. **Frontiers in Psycology**, v. 6, p. 1–11, 2015.

WÓJCIK, W.; ŁUKASIEWICZ, M.; PUPPEL, K. Biogenic amines: formation, action and toxicity - a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 7, p. 2634–2640, 2021.

WOJNOWSKI, W.; NAMIEŚNIK, J.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for in situ determination of biogenic amines in meat: Estimation of meat's freshness. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 130–138, 2019.

WÜST, N.; RAUSCHER-GABERNIG, E.; STEINWIDER, J.; BAUER, F.; PAULSEN, P. Risk assessment of dietary exposure to tryptamine for the Austrian population. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, n. 3, p. 404–420, 2017.

XIE, Z.; WANG, Y.; CHEN, Y.; XU, X.; JIN, Z.; DING, Y.; YANG, N.; WU, F. Tuneable surface enhanced Raman spectroscopy hyphenated to chemically derivatized thin-layer chromatography plates for screening histamine in fish. **Food Chemistry**, v. 230, p. 547–552, 2017.

YANG, C-Y.; CHIU H-F.; CHIU J-F.; CHENG M-F.; KAO W-Y. Gastric cancer mortality and drinking water qualities in Taiwan. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 33, p. 336–340, 1997.

YANG, T.; ZHANG, X. M.; TARNAWSKI, L.; PELELI, M.; ZHUGE, Z.; TERRANDO, N.; LUNDBERG, J. O. Dietary nitrate attenuates renal ischemia-reperfusion injuries by modulation of immune responses and reduction of oxidative stress. **Redox Bioloy**, v. 13, p. 320–330, 2017.

ZAMAN, M. Z.; ABDULAMIR, A. S.; ABU BAKAR, F.; SELAMAT, J.; BAKAR, J. A review : microbiological , physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. **American Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 1199-1211, 2009.

ZYCHOWSKI, J. Impact of cemeteries on groundwater chemistry: a review. **Catena**, v. 93, p. 29–37, 2012.

Artigo 2: Avaliação da fitotoxicidade e citogenotoxicidade de solo: Uma simulação dos impactos da decomposição cadavérica

Letícia Rosa De Souza[1, 2], Maria Aparecida Marin-Morales[1, 2]
[1] Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, SP, (Brasil);
[2] Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP (UNESP).

RESUMO

O crescimento demográfico vem contribuindo com os altos níveis de contaminação ambiental. Uma das atividades antrópicas que se destaca nesse aspecto é a prática de sepultamento de corpos em cemitérios. Apesar de existirem leis que dispõem sobre a regulamentação desta atividade, a contaminação se dá, sobretudo, pelo líquido formado durante a decomposição de cadáveres, denominado necrochorume, que possui em sua composição substâncias tóxicas como as aminas biogênicas cadaverina ($C_5H_{14}N_2$) e putrescina ($C_4H_{12}N_2$). O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial tóxico de amostras de solo expostas à contaminação por necrochorume, mediante a simulação de inumação de uma carcaça suína. Os ensaios foram realizados com amostras de solos e seus extratos aquosos, coletados a diferentes distâncias da carcaça, em 3 diferentes tempos da decomposição. A fitotoxicidade foi avaliada pelo índice de germinação de sementes e mensuração do eixo hipocótilo-radicular de *Lactuca sativa.* Os testes de citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico foram realizados pelos parâmetreos de Índice Mitótico (IM), indução de Aberrações Cromossômicas (AC) e de Micronúcleo (MN), respectivamente, com a espécie *Allium cepa.* Os resultados do teste de germinação de sementes com *L. sativa* não mostraram diferenças significativas entre as amostras testadas (solo e extrato aquoso) e os controles, para nenhum dos tempos testados. O teste de fitotoxicidade, realizado pelo ensaio do crescimento da radícula e do hipocótilo, mostraram que as amostras testadas inibiram o crescimento da radícula e hipocótilo em todos os tempos avaliados. Não foram observados efeitos citotóxicos (IM), porém as amostras induziram efeitos genotóxicos e mutagênico, em sementes de *A. cepa*. Os efeitos da exposição foi intensificado para as sementes germinadas nas amostras do ponto 2 (0,50 m abaixo da carcaça suína em decomposição), nos tempos 2 e 3. O mesmo padrão foi observado nos ensaios realizados para os dois bioindicadores testados. Desse modo, esse estudo reforça a

importância da avaliação e monitoramento das atividades cemiteriais e de seus possíveis impactos ao meio ambiente.

Palavras-chave: *Allium cepa;* contaminação de cemitérios; *Lactuca sativa*; necrochorume; *Sus scrofa domesticus*.

ABSTRACT

Demographic growth has contributed to the high levels of environmental contamination. One of the anthropic activities that stands out in this regard is the practice of burying bodies in cemeteries. Although there are laws that regulate this activity, the contamination occurs above all by the liquid formed during the decomposition of corpses, called cemetery leachate, which has in its composition toxic substances such as cadaverine ($C_5H_{14}N_2$) and putrescine ($C_4H_{12}N_2$). The present study aimed to evaluate the toxic potential of soil samples exposed to contamination by cemetery leachate, by simulating the burial of a swine carcass. The tests were carried out with soil samples and their aqueous extracts, collected at different distances from the carcass, at 3 different decomposition times. Phytotoxicity was evaluated by seed germination index and measurement of the hypocotyl and root of *Lactuca sativa*. The cytotoxicity, genotoxicity and mutagenic potencial tests were performed by the parameters of Mitotic Index (MI), Chromosomal Aberration (CA) and Micronucleus (MN) induction, respectively, with the species *Allium cepa*. The results of the seed germination test with L. sativa did not show significant differences between the tested samples (soil and aqueous extract) and the controls, for none of the times tested. The phytotoxicity test carried out by the root and hypocotyl growth assay showed that the tested samples inhibited the radicle and hypocotyl growth at all evaluated times. No cytotoxic effects (IM) were observed, but the samples induced genotoxic and mutagenic effects in *A. cepa* seeds. The effects of exposure were intensified for seeds germinated in samples from point 2 (0.50 m below the decaying swine carcass), at times 2 and 3. The same pattern was observed in the tests carried out for the two tested bioindicators. Thus, this study reinforces the importance of evaluating and monitoring cemetery activities and their possible impacts on the environment.

Keywords: *Allium cepa*; cemetery leachate*;* contamination of cemeteries; *Lactuca sativa*; *Sus scrofa domesticus*.

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento populacional e a expansão do crescimento urbano foram surgindo novas atividades que acabaram demandando também novas necessidades básicas da sociedade. Muitas atividades humanas têm sofrido alterações ao longo da história, dentre eles os rituais envolvidos os sepultamentos de corpos em cemitérios (SOUZA; SOUZA, 2019). Essas práticas têm se destacado como uma fonte significativa de contaminação ambiental, contribuindo com a formação de poluentes de natureza física, química e biológica (NECKEL et al., 2017; 2020).

Durante as transformações químicas do corpo em decomposição, são liberados subprodutos resultantes da quebra de macromoléculas (IOAN et al., 2017), que constituem o principal agente contaminante do processo putrefativo de corpos, denominado de necrochorume (NECKEL et al., 2017). O necrochorume é caracterizado como um líquido viscoso, de coloração cinza-avermelhada, com odor fétido e um elevado índice de patogenicidade (SILVA, 1998).

Ao longo do processo de decomposição, um corpo, pesando em média 70 kg, pode produzir cerca de 30 litros de necrochorume. Este composto é constituído por água (60%), sais minerais (30%) e substâncias orgânicas (10%), dentre elas, as aminas biogênicas (AB) tóxicas cadaverina ($C_5H_{14}N_2$) e putrescina ($C_4H_{12}N_2$) (SILVA, 1998; CASTRO, 2008). Em quantidades fisiológicas, estas diaminas participam de processos biológicos essenciais de microrganismos, plantas e animais, como a síntese de proteínas e ácidos nucléicos, manutenção da divisão celular e crescimento, regulação da pressão arterial e temperatura corporal, além de exercerem influências na estabilidade da membrana celular e na resposta ao estresse (FEDDERN et al., 2019; PARK; LEE; MAH, 2019; WÓJCIK; ŁUKASIEWICZ; PUPPEL, 2020).

Estudos sobre a toxicidade de AB, decorrentes do processo de decomposição de corpos, ainda são bastante escassos na literatura. Del Rio et al. (2019) avaliaram a citotoxidade destas AB em culturas de células intestinais, cujos resultados mostraram que ambas as aminas induziram apoptose celular.

Outro importante aspecto a se considerar, está associado às questões infra estruturais dos cemitérios, por serem a principal causa de contaminação do solo e recursos hídricos (subterrâneos e superficiais) adjacentes a esses empreendimentos. A instalação de cemitérios sem a realização de estudos ambientais prévios, bem como a má conservação dos

túmulos, contribuem para o carreamento e percolação do necrochorume, de metais presentes nos ornamentos dos caixões e de agentes patogênicos (KEMERICH et al., 2012, 2014; NECKEL et al. 2020). Este problema pode ser agravado, quando as necrópoles estão localizadas nas proximidades dos centros urbanos pois, à medida que os corpos e os componentes dos caixões se degradam e se decompõem, os constituintes orgânicos e inorgânicos liberados podem oferecer riscos à saúde humana, contribuindo para uma maior exposição a contaminantes ambientais (LITODO et al., 2021).

Em função dos riscos de exposição a agentes poluidores, existe hoje uma grande necessidade e preocupação de se conhecer os possíveis efeitos biológicos de xenobióticos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Por esse motivo, há uma eminente necessidade de estudos que possam avaliar o potencial tóxico e os reais efeitos de diferentes contaminantes sobre o meio biológico (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; BIANCHI; MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2015; SOMMAGGIO et al., 2018), incluindo neles os constituintes do necrochorume. Os ensaios toxicológicos se caracterizam como uma importante ferramenta de obtenção de informação sobre a biodisponibilidade de poluentes, bem como para auxiliar na interpretação dos efeitos adversos de contaminantes sobre a biota endêmica e do entorno do local contaminado (LOWE & BUTT, 2007),

Entre os ensaios biológicos usados para avaliar toxicidade de contaminantes ambientais, se destacam aqueles que utilizam bioindicadores vegetais. Estes organismos são considerados sensíveis e responsivos a uma ampla variedade de compostos isolados e em misturas, como as amostras ambientais, além de serem de baixo custo e simplicidade na execução dos testes (GRANT, 1999; LEME; MARIN-MORALES, 2009; SILVEIRA et al., 2017).

A espécie *Allium cepa* é amplamente utilizada como bioindicador para avaliar atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas induzida tanto por compostos químicos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007), quanto por amostras ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009; GONÇALVES et al., 2020; PAMPLONA-SILVA et al., 2020). Bioensaios com *Lactuca sativa* também são eficientes para investigar a fitotoxicidade de diferentes compostos e amostras, utilizando como parâmetro de avaliação a germinação de sementes e o crescimento radicular (VALERIO; GARCÍA; PEINADO, 2007; MTISI; GWENZI, 2019, SOUZA et al., 2020).

Considerando os impactos ambientais promovidos pelos sepultamentos de corpos em cemitérios e a ausência de estudos ecotoxicológicos relacionados ao necrochorume, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial fitotóxico e citogenotóxico de amostras de solo impactado por processo de decomposição de uma carcaça suína, por meio de bioensaios realizados com as espécies *A. cepa e L. sativa*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Experimento de inumação

A simulação de contaminação por sepultamento foi realizada pela inumação de uma carcaça suína recém abatida, com cerca de 11 kg, obtida em um abatedouro local, nas dependências do Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro/ SP, Brasil (lat 23°23'47"S e long 47°32'41"O). As carcaças de porcos têm sido cada vez mais utilizada como modelo animal em estudos que envolvem a simulação do processo de decomposição de corpos (BELK et al, 2019; MATUSZEWSKI et al., 2020). Para este ensaio, foi utilizada uma estrutura cilíndrica de aço inox galvanizado, de 2 m de comprimento por 0,5 m de diâmetro. A estrutura foi vedada em sua base, para impedir o extravasamento de qualquer líquido derivado da decomposição para fora do sistema, garantir que todo material exsudado pudesse ser avaliado e impedir eventuais contaminações do solo ou do lençol freático do local onde foi realizado experimento.

O cilindro foi preenchido, primeiramente, com uma camada de aproximadamente 20 cm com esferas de vidro (bolinhas de gude), simulando a região de granulação do solo, estrato esse também usado para auxiliar o escoamento dos possíveis líquidos (necrochorume) gerados durante processo de putrefação. Logo acima da camada de esferas de vidro foi colocado o solo referência, coletado no Jardim Experimental da UNESP do campus de Rio Claro/SP, cuja característica é de ser um solo de textura argilosa (Mazzeo et al., 2015), até preencher cerca de 1,5 m da altura do tubo. Por fim, a carcaça foi disposta verticalmente na parte apical da estrutura e recoberta com cerca de 0,50 cm do mesmo solo referência.

O cilindro contou ainda com aberturas ("janelas") ao longo de seu comprimento, que foram feitos a cada 50 cm, totalizando 3 janelas (0,50; 1,0; 1,5 m de distância da base do tubo), para acoleta do solo em diferentes distâncias da carcaça, caracterizando, assim, 4

pontos de coletas: P1- localizado na superfície do cilindro, portanto mais próximo da carcaça suína; P2 – a 1,5 m da base do cilindro; P3 – a 1m da base do cilindro; P4 – a 0,50 m da base do cilindro. Na base do tubo foi instalada uma torneira, para eventuais coletas de substâncias lixiviadas, porém os produtos resultantes da decomposição da carcaça não atingiram a devida profundidade, fato que impediu tal coleta.

O experimento de inumação da carcaça suína foi realizado em 14/08/2019. As coletas de solo foram feitas com o auxílio de um trado, introduzido nos quatro pontos de coleta citados (P1, P2, P3 e P4), em três tempos distintos (T1: 26/08/2019, 12 dias após a inumação; T2: 13/09/2019, 30 dias após a inumação e T3: 12/11/2019, 90 dias após a inumação). Juntamente com as amostras coletadas, foram realizados ensaios com o solo referência (controle ambiental), cujos resultados foram comparados com os dos tratamentos. A realização do experimento em cilindro de aço inox garantiu a integridade da análise da contaminação do solo, nos seus diferentes estratos e tempos do processo da decomposição da carcaça.

2.2 Condições pluviométrica dos dias de coleta e do tempo total da simulação da decomposição cadavérica.

Os dados referentes a pluviosidade dos meses em que foi realizada a simulação da decomposição da carcaça suína (agosto, setembro, outubro e novembro), utilizada para avaliar os eventos de contaminação de solos de ambientes de cemitérios (Anexo 1), foram extraídos do site: Agritempo (www.agritempo.gov.br).

2.3 Preparo das amostras para avalição de compostos tóxicos hidrossolúveis

2.3.1 Obtenção dos extratos aquosos

Além das análises com as amostras sólidas (brutas), também foram realizados ensaios com seus respectivos extratos aquosos, para estimar os efeitos tóxicos das substâncias hidrossolúveis presentes nas amostras. Essa análise é um importante parâmetro de avaliação, pois permite inferir a presença de contaminantes passíveis de serem carreados pela água.

Os extratos utilizados nos bioensaios foram obtidos seguindo o protocolo proposto pela ABNT NBR 10.006 (2004). Para a obtenção dos extratos aquosos de cada solo amostrado, foram misturados 125 g do solo correspondente (com base no seu peso seco) em

500 ml de água destilada. As soluções foram agitadas continuamente, em baixa velocidade (velocidade do mixer: 4 e 5), por um período de 5 minutos. Após 7 dias de decantação a 22 °C, os sobrenadantes foram coletados, filtrados em membrana de 0,45 μm de porosidade, para a obtenção dos extratos contendo as substâncias hidrossolúveis.

Para a verificação do peso seco, 3 placas de Petri com 10 g de cada amostra de solo permaneceram em estufa a 105 °C por 24 h. Decorrido este período, as placas foram pesadas em balança de precisão, para a obtenção do peso final. Para evitar que as amostras incorporassem a umidade do ambiente em sua massa, foi feito o seu resfriamento em um dissecador. O cálculo do conteúdo da água existente em cada amostra foi feito pela diferença entre o peso inicial e peso final.

2.3.2 Capacidade de retenção de água no solo (WHC)

O cálculo da capacidade máxima de retenção de água no solo (Water Holding Capacity – WHC) foi realizado seguindo o protocolo proposto pela norma ABNT NBR ISO 11269 - 2:2014. Cadinhos de porcelana foram preenchidos com solo e submersos em um recipiente com água à temperatura ambiente, por um período de 2 h. Em seguida, os cadinhos foram mergulhados abaixo do nível da água, por mais 1 h. Para drenar a água, os cadinhos foram colocados em uma peneira apoiada em um recipiente, por 2h. Por fim, as amostras foram dispostas em estufa a 105 °C, até a obtenção de massa constante. A capacidade de retenção de água foi então calculada como a porcentagem de massa seca. Esta etapa foi realizada em triplicata, sendo estabelecido para os testes WHC (70%). Para a realização desta etapa, o tubo e papel de filtro recomendado pela norma foi substituído por cadinhos com pedra porosa de porosidade 1 (100-160 μm), processo esse também indicado pelo ensaio.

2.4 Bioensaios

Todos os bioensaios realizados com as amostras brutas de solo derivadas do processo de decomposição da carcaça suína e com os extratos aquosos desse solo foram desenvolvidos no Laboratório de Mutagênese Ambiental da UNESP, campus de Rio Claro/ SP, Brasil.

2.4.1 Bioensaios com *Lactuca sativa*

O bioensaio com *L. sativa* foi realizado com sementes da variedade Grand rapids (Isla). Foram desenvolvidos dois tipos de ensaios, um com os solos coletados nos diferentes pontos de coleta do cilindro de aço inox (nos diferentes tempos de decomposição cadavérica) e o outro com extratos aquosos desses mesmos solos brutos testados. Foram dispostas 20 sementes de alface em placas de Petri preenchidas com dois tipos de amostras: 30 g dos solos obtidos no processo de decomposição da carcaça suína e também com papéis de filtro embebidos com 4 ml dos extratos aquosos das mesmas amostras brutas. As placas foram incubadas em BOD, por um período de 120 h, a uma temperatura de 22 +/- 2 °C, no escuro. O controle negativo (CN) foi realizado com água destilada (4 ml) e o controle positivo (CP) com sulfato de zinco heptaidratado (0,005M - $ZnSO_47H_2O$) (4 ml). O experimento foi conduzido em triplicata e de forma inteiramente casualizada. Após o período de incubação, foram contabilizadas as sementes germinadas, para a obtenção da porcentagem de germinação (relação entre o número de sementes germinadas/total de sementes dispostas por placa x 100).

Para a análise de crescimento, foram aferidos, com o auxílio de um paquímetro digital, os comprimentos das radículas e dos hipocótilos, de todas as sementes germinadas. Os resultados destas análises foram utilizados para estimar a inibição da elongação radicular.

Os dados foram avaliados usando o software STATISTICA 7.0 para as análises de normalidade e homogeneidade de variância, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente. Para a análise de significância das diferenças registradas para a germinação, comprimento do hipocótilo e da radícula, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p<0,05$), pelo programa estatístico GraphPad Prism 8 (versão 8.0.1).

2.4.2 Bioensaios com *Allium cepa*

Para os ensaios com *A. cepa*, 100 sementes da variedade Baia periforme (Isla), foram dispostas em placas de Petri preenchidas com 30 g dos solos coletados nos diferentes estratos do cilindro de aço, onde a carcaça suína foi inumada, e também com os extratos aquosos desses solos, assim como foi feito nos ensaios com *L. sativa.* Contudo, o volume do extrato aquoso utilizado nos testes com *A. cepa* foi maior (5 ml) que o utilizado nos ensaios com *L. sativa*. Os tratamentos controles foram realizados com água de osmose reversa (Controle Negativo – CN), em solo referência, o mesmo solo usado no preenchimento do cilindro de

aço inox descrito anteriormente (controle ambiental – CA) e em trifluralina (na concentração de 0,84 mg/L), para o controle positivo (CP). As placas foram incubadas em BOD por 5 dias, mantidas a uma temperatura de 22 +/- 2 °C, com fotoperíodo de 12h. Todos os ensaios foram desenvolvidos em triplicata.

Após a germinação, as radículas com cerca de 2,0 cm de comprimento foram coletadas e fixadas por 6 horas em Carnoy (etanol: ácido acético glacial, 3:1, v/v), em temperatura ambiente. Após este tempo, o fixador foi trocado por um recém-preparado, para posterior armazenamento das raízes a 4 °C, até a sua utilização na confecção das lâminas. Os ensaios realizados com células meristemáticas de radículas de *A. cepa,* foram realizados de acordo com o protocolo proposto por Grant (1982), com algumas modificações descritas por Leme e Marin-Morales (2009).

Para o teste de AC, foram considerados diferentes tipos de aberrações, como, perdas, quebras, pontes e aderências cromossômicas, entre outros, que foram observados em todas as fases de divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). Como *endpoint* de genotoxicidade, foram consideradas todas as aberrações cromossômicas encontradas, exceto as quebras cromossômicas. O potencial mutagênico foi obtido pela porcentagem de células portadoras de micronúcleos (MN) e também de células que apresentaram quebras cromossômicas, em relação ao total de células analisadas. O índice mitótico (IM), obtido pela razão do número de células em divisão sobre o número total de células analisadas, constituiu o parâmetro de citotoxicidade das amostras utilizadas nestes ensaios.

Os parâmetros citados foram obtidos pela contagem de cerca de 500 células por lâmina, para um total de 12 lâminas avaliadas/tratamento, totalizando cerca de 6.000 células/tratamento.

Os dados foram avaliados usando o software STATISTICA 7.0 para as análises de normalidade e homogeneidade de variância, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p<0,05$), pelo programa estatístico GraphPad Prism 8 (versão 8.0.1), como sugerido por Mazzeo e Marin-Morales (2015) e Gonçalves et al. (2020).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Bioensaio com *L. sativa:* Teste de germinação e crescimento radicular e do hipocótilo

Pelos ensaios de germinação realizados com sementes de *L. sativa*, foi possível observar que todas as amostras testadas (solos e extratos aquosos) dos diferentes pontos de coletas (P1, P2, P3 e P4) e tempos (T1, T2 e T3) do processo de decomposição da carcaça suína, não induziram efeitos significativos de fitotoxicidade, em relação aos dados obtidos no CN e no CA (Figura 1). De acordo com Sobrero e Ronco (2008), a germinação é uma etapa muito sensível à ação de substâncias tóxicas. No entanto, devido à ausência de efeitos adversos à germinação observados no presente estudo, pode-se inferir que os compostos presentes nas amostras analisadas não foram fitotóxicos para o organismo testado.

///

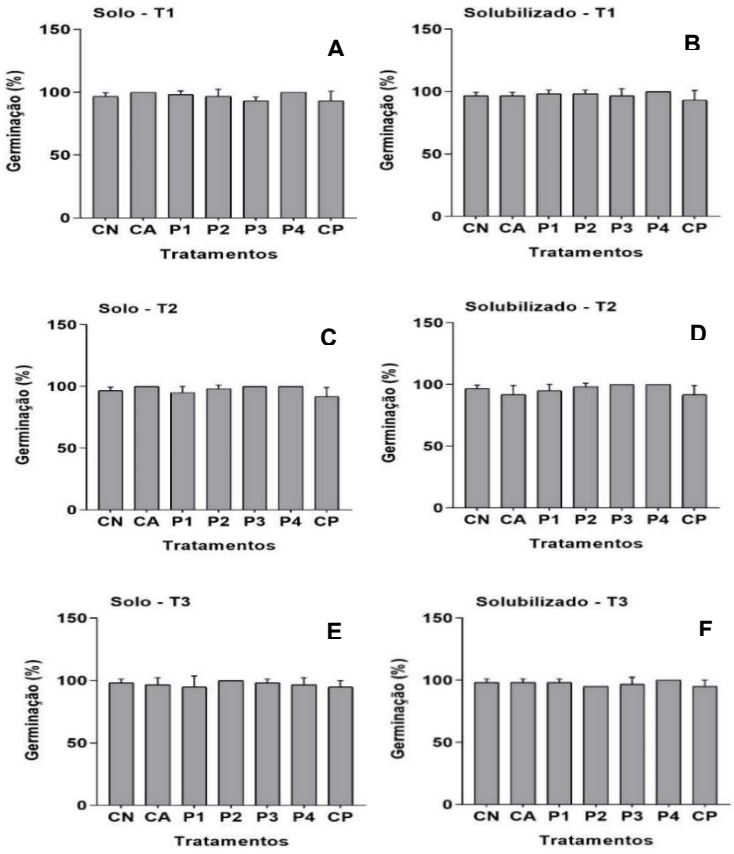


Figura 1: Resultados dos bioensaios de germinação realizados com *Lactuca sativa*. CN: controle negativo; CP: controle positivo; CA: controle ambiental; P1: ponto 1 (superfície do cilindro); P2: ponto 2 (1,5 m da base do cilindro); P3: ponto 3 (1 m da base do cilindro); P4: ponto 4 (0,50 m da base do cilindro); T1: tempo 1 (12 dias após a inumação); T2: tempo 2 (30 dias após a inumação); T3: tempo 3 (90 dias após a inumação). (Mann-Whitney: (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$; (****) $p<0,0001$).

Ensaios que avaliam alterações no crescimento inicial de espécies vegetais são amplamente utilizadas para a identificar efeitos tóxicos de diferentes contaminantes (SILVEIRA et al., 2017), se caracterizando como bons indicativos de ação fitotóxica. Os ensaios de toxicidade realizados pelos parâmetros de elongação da radícula e do hipocótilo indicaram potencial fitotóxico, em relação ao CN, para as todas as amostras testadas (diferentes pontos e tempos de coleta), com exceção do P3 em T1, como pode ser observado na Figura 2.

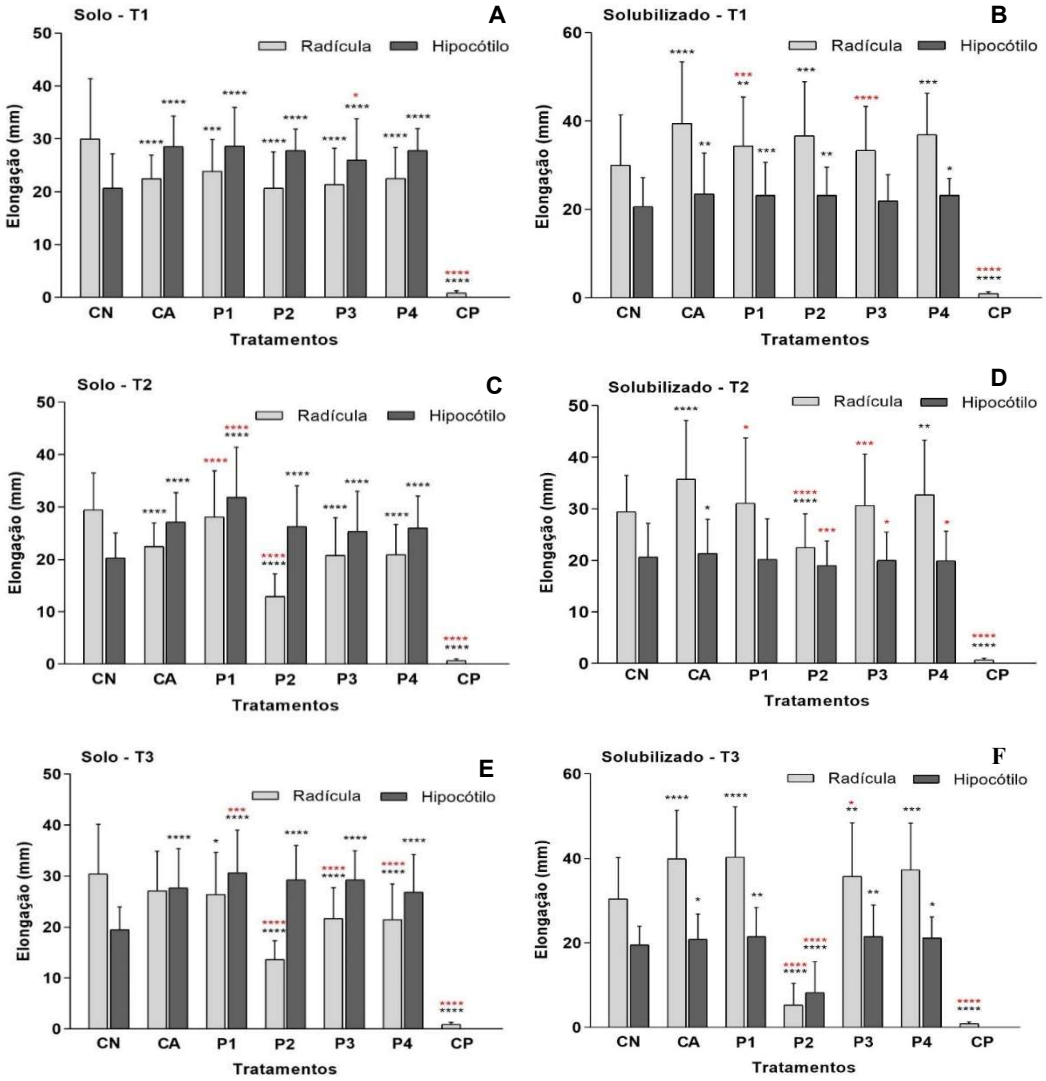


Figura 2: Resultado do bioensaio de crescimento de radícula e hipocótilo em *Lactuca sativa*. CN: controle negativo; CP: controle positivo; CA: controle ambiental; P1: ponto 1 (superfície do cilindro); P2: ponto 2 (1,5 m da base do cilindro); P3: ponto 3 (1 m da base do cilindro); P4: ponto 4 (0,50 m da base do cilindro); T1: tempo 1 (12 dias após a inumação); T2: tempo 2 (30 dias após a inumação); T3: tempo 3 (90 dias após a inumação). * preto: diferença significativa em relação ao CN (Mann-Whitney: $p<0,05$). * vermelho: diferença significativa em relação ao CA (Mann-Whitney: $p<0,05$). (Mann-Whitney: (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$; (****) $p<0,0001$).

Considerando que foram observados resultados significativos na elongação de radícula/hipocótilo de *L. sativa* do CA, em relação ao CN, pode-se concluir que o solo usado como referência já apresentava compostos que podiam estar interferindo nos resultados dos ensaios. Desta forma, os resultados obtidos nos tratamentos foram também comparados com os do CA (Figura 2).

Como a atividade fitotóxica foi observada já no tempo inicial (T1) do experimento de inumação, foi considera a possibilidade de o efeito observado estar associado à presença de compostos alelopáticos no solo utilizado na simulação, uma vez que esse solo foi coletado em uma área com cobertura vegetal estável e preservada do campus da UNESP de Rio Claro. Estes compostos orgânicos, que são liberados no meio ambiente por lixiviação e volatilização da folhagem, exsudação das raízes das partes aéreas das plantas e pela decomposição de resíduos vegetais, podem inibir o crescimento das plantas (KOBAYASHI, 2004; SCAVO; ABBATE; MAUROMICALE, 2019).

Pelas comparações dos resultados das sementes germinadas no solo com os resultados do CA, foi observado que os efeitos fitotóxicos foram mais significativos a partir do T2. A inibição do crescimento radicular de *L. sativa* foi mais pronunciada para os solos coletados no P2, nos tempos T2 e T3 (Figura 2 – C e E). Para as sementes germinadas no extrato aquoso, também foi observada a inibição do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo para o mesmo ponto (P2), nos tempos T2 e T3 quando comparado ao CA (Figura 2 – D e F).

Como pode ser observado na figura 2, os efeitos fitotóxicos foram mais pronunciados para as sementes expostas ao extrato aquoso do P2 em T3 (Figura 2 – F). Essas respostas podem ser explicadas pela proximidade deste ponto com a carcaça suína, já em estado avançado de decomposição, para os tempos T2 e T3. Essa explicação tem por base a maior umidade observada para o solo de P2, bem como a evidência de um líquido viscoso de cor acinzentada (necrochorume) de cheiro desagradável. (Figura 3).

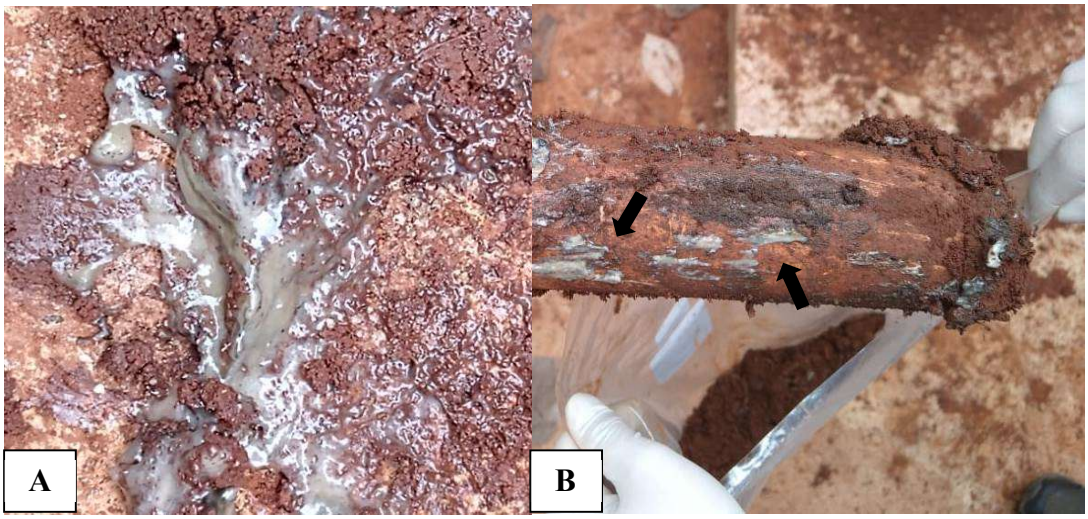


Figura 3: Evidência da presença de necrochorume no solo. A: Líquido viscoso de cor acinzentada (necrochorume). B: Presença de necrochorume no momento da coleta (setas). Fonte: registrado pela própria autora.

Como já mencionado neste trabalho, o necrochorume possui em sua composição as diaminas tóxicas cadaverina e putrescina (SILVA, 1998, CASTRO, 2008). Contudo, existem poucas informações na literatura científica sobre a ação fitotóxica destes contaminantes. Os dados de fitotoxicidade de solo contaminado com necrochorume, observados neste estudo, pelos ensaios de desenvolvimento da radícula/hipocótilo mostram uma resposta diferente em relação aos dados obtidos com o extrato aquoso do solo. De modo geral foi observada uma maior inibição da elongação da radícula para as sementes expostas ao solo e do hipocótilo para as sementes expostas ao extrato aquoso.

Essas respostas devem estar associadas aos diferentes compostos presentes no solo bruto e no extrato aquoso do mesmo. A extração de compostos por solubilização é um processo que que visa diluir essas substâncias em meio aquoso. Como uma forma das formas de entrada de agentes tóxicos no ambiente aquático se dá por diluição de compostos presentes em resíduo sólido, a análise da toxicidade de extratos aquosos de componentes de solos contaminados pode trazer informações importantes sobre os impactos que esses compostos podem promover na biota local (ZAGATTO et al., 1992; RODRIGUES, 2007).

Meral et al. (2005) constataram a inibição do crescimento radicular de sementes de *Arabidopsis thaliana* exposta à germinação em diferentes concentrações de putrescina.

Outros trabalhos também descrevem inibição das funções celulares relacionadas desenvolvimento vegetal pela ação da cadaverina e putrescina (UNAL et al., 2008; RAJPAL; TOMAR, 2020). Como o necrochorume é rico nesses compostos, e ele estava presente nas amostras coletadas, principalmente no P2 em T2 e T3, podemos inferir que alterações de elongação radicular/hipocótilo, observadas no P2, podem ser devido à ação conjunta dessas animas.

3.2 Bioensaio com *A. cepa*: Avaliação do potencial citogenotóxico e mutagênico

Os resultados dos ensaios de índice mitótico, realizados com células meristemáticas de *A. cepa* expostas às amostras de solo e extratos aquosos, para diferentes tempos de decomposição da carcaça suína, estão apresentados na Figura 4. Assim como nos ensaios realizados com *L.* sativa, a avaliação dos testes com *A. cepa* foi conduzida por meio da comparação dos tratamentos em relação ao CN e ao CA, uma vez que existe a possibilidade da presença de compostos alelopáticos no solo utilizado na simulação de contaminação realizada. No entanto, em relação aos efeitos citotóxicos, genotóxicos e potencial mutagênico não houveram diferenças estatisticamente significativas entre o CN e o CA. Dessa forma, o solo referência (CA) não foi capaz de causar tais alterações.

De acordo com os resultados, a exposição de sementes de cebola às diferentes amostras derivadas do processo de decomposição da carcaça suína, não induziu diminuição no índice de divisão celular (Índice mitótico - IM), para nenhum dos tempos avaliados, em relação ao CN e CA. Portanto, conforme apresentado na Figura 4, não foram observados efeitos citotóxicos nem para os solos nem para os extratos aquosos desses solos.

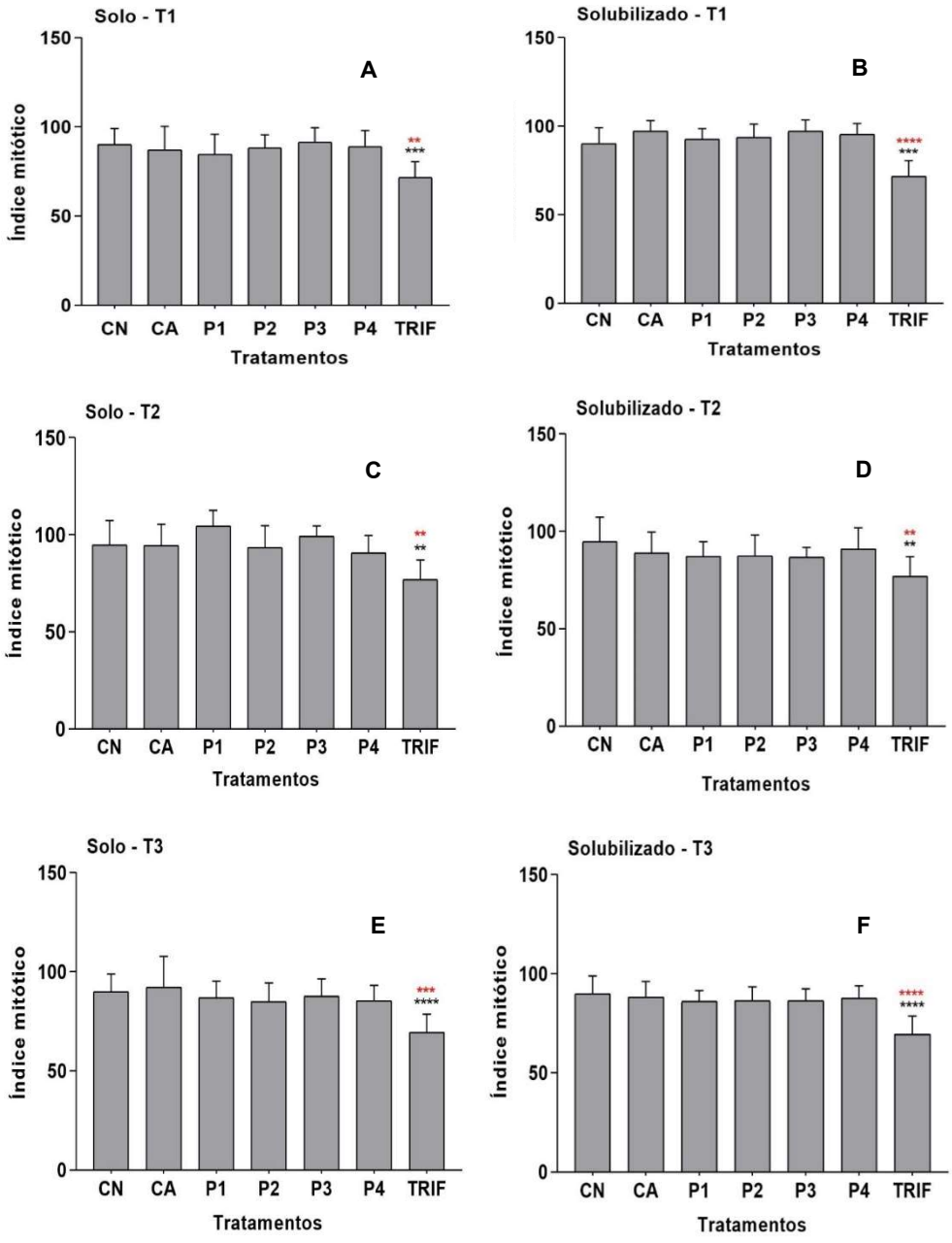


Figura 4: Resultado do bioensaio de citotoxicidade em *Allium cepa*. CN: controle negativo; TRIF: Trifluralina - controle positivo; CA: controle ambiental; P1: ponto 1 (superfície do cilindro); P2: ponto 2 (1,5 m da base do cilindro); P3: ponto 3 (1 m da base do cilindro); P4: ponto 4 (0,50 m da base do cilindro); T1: tempo 1 (12 dias após a inumação); T2: tempo 2 (30 dias após a inumação); T3: tempo 3 (90 dias após a inumação). * preto: diferença significativa em relação ao CN (Mann-Whitney: $p<0,05$). * vermelho: diferença significativa em relação ao CA (Mann-Whitney: $p<0,05$). (Mann-Whitney: (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$; (****) $p<0,0001$).

Os resultados da frequência de aberrações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN), observadas em meristemas radiculares de *A. cepa,* expostos às amostras de solo e extratos aquosos, para os diferentes tempos de decomposição avaliados, estão apresentados na Figura 5. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, todas as amostras analisadas, considerando tanto os diferentes pontos como os tempos de coleta, induziram AC, porém nem todas diferiram significativamente do CN e CA.

Essas alterações não significativas observadas podem ser consideradas alterações basais, uma vez que algumas delas também apareceram nos ensaios realizados com o CN e CA, não se caracterizando, assim, em um evento citogenotóxico e/ou mutagênico. No entanto, foram observados resultados estatisticamente significativos para AC e AN dos meristemas expostos aos solos e extratos aquosos obtidos no P2, em T2 e T3 (Figura 5) quando comparados ao CN e ao CA.

Esses resultados obtidos para o P2 (T2 e T3) corroboram com respostas aos bioensaios realizados com *L. sativa,* para as mesmas amostras. As alterações mais encontradas neste nesta análise de AC e AN foram os brotos nucleares e os MN (Figura 6), indicando uma maior potencialidade mutagênica dessas amostras. Pelas alterações induzidas, também é possível afirmar que o necrochume apresenta tanto substâncias clastogênicas como aneugênicas, uma vez que foram registradas aberrações decorrentes de quebra cromossômicas bem como de amplificação do material genético.

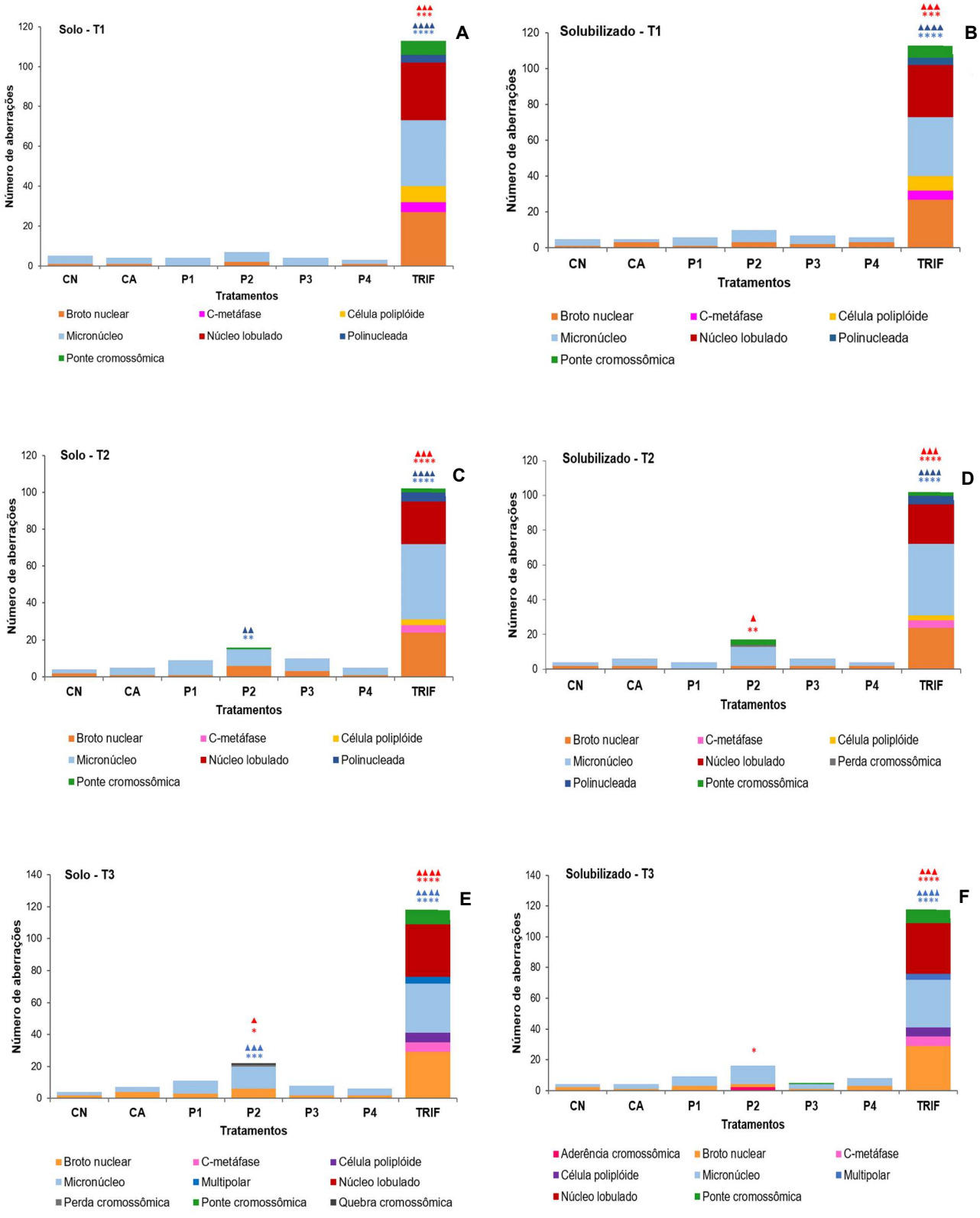


Figura 5: Frequência de AC e nucleares em sementes de *Allium cepa*. CN: controle negativo; TRIF: Trifluralina - controle positivo; CA: controle ambiental; P1: ponto 1 (superfície do cilindro); P2: ponto 2 (1,5 m da base do cilindro); P3: ponto 3 (1 m da base do cilindro); P4: ponto 4 (0,50 m da base do cilindro); T1: tempo 1 (12 dias após a inumação). * azul: diferença significativa em relação ao CN para genotoxicidade. * vermelho: diferença significativa em relação ao CN para potencial mutagênico; ▲ azul: diferença significativa em relação ao CA para genotoxicidade; ▲ vermelho: diferença significativa em relação ao CA para potencial mutagênico (Mann-Whitney: (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$; (****) $p<0,0001$).

Os efeitos citogenotóxicos e o potencial mutagênico de diferentes contaminantes ambientais têm sido amplamente avaliado por bioensaios, dentre eles os realizados com o bioindicador *A. cepa.* Muitas das avaliações dos potenciais genotóxico e mutagênico de substâncias químicas e de amostras ambientais complexas descritas na literatura científica foram realizadas com esse sistema teste (LEME; MARIN-MORALES, 2009, SILVEIRA et al., 2017; PAMPLONA-SILVA et al., 2020). Os ensaios e AC e AN, realizados com esse bioindicador, são considerados efetivos para avaliar potenciais citogenotóxicos e mutagênicos de contaminantes ambientais presentes em amostras complexas (SOBRAL et al., 2015; HARA; MARIN-MORALES, 2017; GONÇALVES et al., 2020; PAMPLONA-SILVA et al., 2020), por apresentarem características citogenéticas especiais, como cromossômico grande e em número reduzido (2n= 16), além de serem ensaios de baixo custo e apresentarem alta correlação com os ensaios desenvolvidos com outros sistemas biológicos, como os testes com mamíferos (LUBINI et al., 2008; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012). Assim, quando ensaios com esses bioindicadores exibem frequências elevadas de AC e AN, podemos associá-las a possíveis instabilidades genéticas, decorrentes da exposição às condições ambientais desfavoráveis (BEZRUKOV; LAZARENKO, 2002).

Os MN são corpos extra-nucleares constituídos de fragmentos de cromossomos derivados de quebras cromossômicas e/ou de cromossomos inteiros, que foram perdidos durante o processo de divisão celular. Essas estruturas podem ser induzidas por defeitos na maquinaria de reparo celular e acúmulo de danos ao DNA, bem como por eventos promotores de aberrações cromossômicas e por mecanismos epigentéticos. Muitos agentes genotóxicos podem induzir a formação de MN e, consequentemente, desencadear vários efeitos celulares que podem causar desde à morte celular, instabilidades genômicas ou desenvolvimento de câncer (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013).

Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007; 2009), citam ainda que os micronúcleos podem também ser derivados da eliminação de material genético excedente, resultante da amplificação do conteúdo genético, devido a falhas em estruturas citoplasmáticas, como por exemplo nos fusos mitóticos. A ocorrência de MN pode estar relacionada a diferentes ações de substâncias tóxicas sobre a molécula de DNA. A ação clastogênica é induzida por agentes que interagem diretamente com a cromatina, descaracterizando a sua estrutura e promovendo quebras cromossômicas. Na ação aneugênica, o agente tóxico age em estruturas

citoplasmáticas como, por exemplo os fusos mitóticos. Neste caso, o agente interfere nos processos de polimerização e despolimerização dessas estruturas, que leva a perdas de cromossomos inteiros. Os dois eventos citados se estabelecem como pequenos núcleos nas células, denominados de MN.

Os brotos nucleares, de acordo com Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007; 2009), são igualmente resultantes da exclusão do material genético excedente do núcleo, derivados também de processos de poliploidização do material genético. Os brotos nucleares são precursores dos MN derivados de poliploidizações cromossômicas.

Embora existam poucos estudos sobre o potencial de ação biológica do necrochorume, o aumento significativo d MN e brotos nucleares encontrados neste estudo sugere potencial genotóxico e mutagênico para esse composto. Esse efeito observado é corroborado pelos estudos de Unal et al. (2008). Os autores observaram que radículas de *A. cepa* expostas a amina putrescina apresentaram um aumento da frequência de MN. Essa correlação entre o efeito de putrescina e o necrochorume se deve ao fato dessa AB ser uma das principais substâncias tóxicas presentes no necrochorume.

O estudo realizado também apresentou limitações importantes, uma vez que o solo utilizado para preencher o cilindro não conservou seu perfil vertical.

Pela falta de estudos sobre os efeitos biológicos do necrochorume, há uma grande necessidade de se investigar esse tipo de contaminante, devido aos sérios impactos que ele pode promover ao meio ambiente e à saúde humana. Espera-se com este estudo alertar os órgãos governamentais e a população sobre os perigos da contaminação por atividades cemiteriais, bem como incentivar mais estudos com esse tipo de contaminante. Ainda são necessárias muitas informações nesta área, para que se possa ter um melhor entendimento da ação deste contaminante sobre diferentes organismos testes.

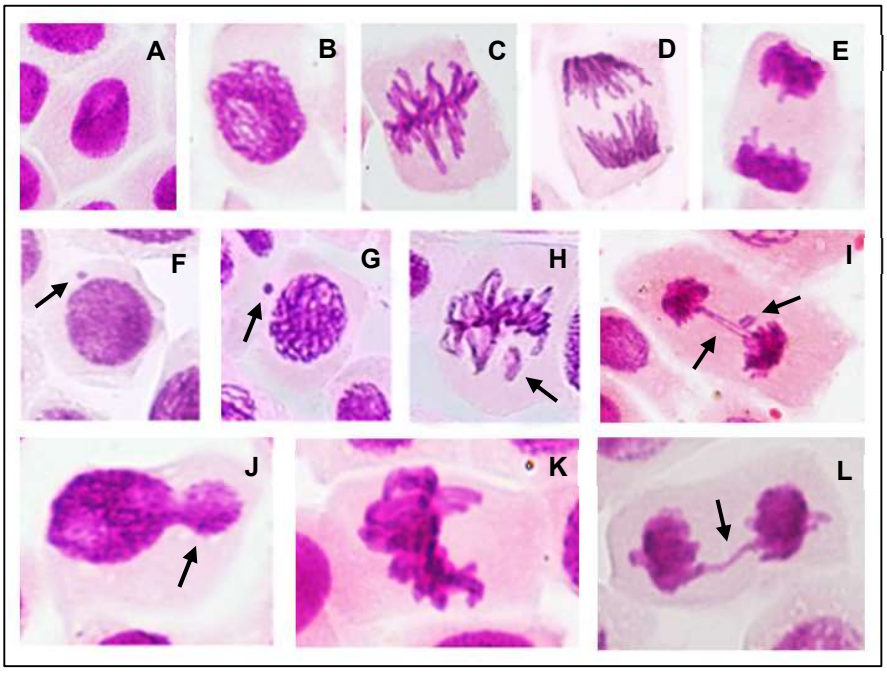


Figura 6: Aberrações cromossômicas e alterações nucleares observadas nos ensaios de genotoxicidade e potencial mutagênico em células meristemáticas de *A. cepa*. A: intérfase normal; B: prófase normal; C: metáfase normal; D anáfase normal; E: telófase normal; F: micronúcleo em intérfase (seta); G: micronúcleo em prófase (seta); H: perda cromossômica (seta); I: ponte dupla com quebra em telófase (setas); J: broto nuclear (seta); K: aderência cromossômica; L: ponte em telófase (seta). Aumento: 1000X.

4 CONCLUSÃO

A simulação de inumação de carcaça suína se mostrou eficiente para avaliar os efeitos fitotóxicos, citogenotóxicos e mutagênicos do necrochorume derivado da decomposição do animal utilizado;

As espécies *L. sativa* e *A. cepa* se mostram bons bioindicadores a serem utilizados em avaliação de contaminação derivada de atividade cemiterial. A espécie *L. sativa* foi mais eficiente para a avaliação de fitotoxicidade, principalmente pela utilização dos parâmetros elongação da radícula e do hipocótilo, e *A. cepa* para a avaliação dos potenciais citogenotóxicos e mutagênicos do necrochorume.

O teste de germinação realizado com *L. sativa* não se mostrou sensível para avaliar a toxicidade das amostras estudadas, tampouco o teste de IM, realizado com o bioindicador *A. cepa*.

Os componentes do necrochorume interferiram no desenvolvimento das raízes e do hipocótilo e induziram aberrações cromossômicas e nucleares nos bioindicadores vegetais utilizados.

As aberrações cromossômicas mais frequentes foram MN e brotos nucleares, AC que identificam tanto ação clastogênica como aneugênica, respectivamente, para os componentes do necrochorume.

Os períodos que mostraram maior comprometimento do solo pelos exsudados da decomposição foram o T2 (30 dias após a inumação) e T3 (90 dias após a inumação). O ponto que sofreu o maior impacto foi o P2, o que sugere ser decorrente da facilidade de percolação do exsudado, por este estar situado logo abaixo da carcaça (0,50 m abaixo da mesma).

5 REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIACÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004. NBR 10006: **Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. ABNT, Rio de Janeiro.

AGRITEMPO. Sistema de Monitoramento Agrometereológico. Pesquisa de Dados Metereológicos. Disponível em: https://www.agritempo.gov.br/agritempo/jsp/PesquisaClima/index.jsp?siglaUF=SP&lang=pt_br. Acesso em 06 Set. 2021.

BELK, A. D.; DEEL, H. L.; BURCHAM, Z. M.; KNIGHT, R.; CARTER, D. O.; METCALF, J. L. Animal models for understanding microbial decomposition of human remains. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 28, p. 117-125, 2019.

BEZRUKOV, V. F.; LAZARENKO, L. M. Environmental impact on age-related dynamics of karyotypical instability in plants. Mutation Research, v.520, p.113-118, 2002.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 102-111, 2015.

CARITA, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. Chemosphere, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008.

CASTRO, D. L. Caracterização geofísica e hidrogeológica do cemitério Bom Jardim, Fortaleza – CE. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 26, p. 251-271, 2008.

DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; LINARES D. M.; LADERO, V.; RUAS-MADIEDO, P.; FERNANDEZ, M.; MARTIN, M. C.; ALVAREZ, M. A. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, v. 9, n. 120, p. 1-7, 2019.

FEDDERN, V.; MAZZUCO, H.; FONSECA, F. M. DA; LIMA, G. J. M. M. DE. A review on biogenic amines in food and feed: toxicological aspects, impact on health and control measures. **Animal Production Science**, v. 59, n. 4, p. 608–618, 2019.

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

GONÇALVES, M. M. C.; DE ALMEIDA LOPES, A. C.; GOMES, R. L. F.; DE MELO, W. J.; ARAUJO, A. S. F.; PINHEIRO, J. B.; MARIN-MORALES, M. A. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of composted tannery sludge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 34495–34502, 2020.

GRANT, W. F. 1982. Chromosome aberration assays in allium: A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, 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. **Mutation Research**, v. 624, p. 107-112, 1999.

HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. *In vitro* and *in vivo* investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State e Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321-330, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.142

IDOTO, A. U.; ENEJI, I. I.; AGBENDEH, Z. M.; KORMI, A. A. Estimation of embalming contaminants in soil and groundwater samples from cemetery leachates in Mbaiorbo, Mbadim-Mbatiav leachfield in Gboko, Nigeria. **Journal of Chemical Society of Nigeria**, v. 46, n. 3, p. 482-493, 2021.

IOAN, B. G.; MANEA, C.; HANGANU, B.; STATESCU, L.; GHEUCASOLOVASTRU, L.; MANOILESCU, I. The Chemistry decomposition in human corpses, **REVISTA DE CHIMIE**, v. 68, n. 6, p. 1352-1356, 2017.

KEMERICH, P. D. C.; BIANCHINI, D. C.; FANK, J. C.; BORBA, W. F.; WEBER, D. P.; UCKER, F. E. The environmental issue involving cemeteries in Brazil. **REMOA**, v. 13, n. 5, p. 3777-3785, 2014.

KEMERICH, P. D. C.; UCKER, F. E.; BORBA, W. F. Cemitérios como fonte de contaminação ambiental. **Scientific American Brasil**, v. 1, p. 78-81, 2012.

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

LOWE, C. N.; BUTT, K. R. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: a critical review. **European Journal of Soil Biology**, v. 43, p. 281-288, 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.028.

LUBINI, G.; FACHINETTO, J. M.; LAUGHINGHOUSE, I. V. H. D.; PARANHOS, J. T.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, v. 63, p. 647-51, 2008.

LUZHNA; L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontier in Genetics**, v. 11, p. 1-17, 2013.

MATUSZEWSKI, S.; HALL, M. J. R.; MOREAU, G.; SCHOENLY, K. G.; TARONE, A. M.; VILLET, M. H. Pigs vs people: the use of pigs as analogues for humans in forensic entomology and taphonomy research. **International Journal of Legal Medicine**, v. 134, p. 793-810, 2020.

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. **Ecological Indicators**, v. 56, p. 60–69, 2015.

MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 9796-9806, 2015.

MERAL U, ISMAILOGLU I, PALAVAN-UNSAL N. The effect of putrescine and difluoromethylornithine on cell division activity of wheat in different ploidy level. **Caryologia**, v. 58, p. 15-20, 2005 https://doi.org/10.1080/00087114.2005.10589426.

MTISI, M.; GWENZI, W. Evaluation of the phytotoxicity of coal ash on lettuce (*Lactuca sativa* L.) germination, growth and metal uptake. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 750-762, 2019.

NECKEL, A.; COSTA, C.; MARIO, D. N.; SABADIN, C. E. S.; BODAH, E. T. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. **Revista Brasileira de Gestão Urbana**, v. 9, n. 2, p. 216-230, 2017.

NECKEL, A.; KORCELSKI, C.; KUJAWA, H. A.; SCHAEFER DA SILVA, I.; PREZOTO, F.; WALKER AMORIN, A. L.; MACULAN, L. S.; GONÇALVES, A. C.; BODAH, E. T.; BODAH, B. W.; DOTTO, G. L.; SILVA, L. F. O. Hazardous elements in the soil of urban cemeteries; constructive solutions aimed at sustainability. **Chemosphere**, v. 262, p. 1-13, 2020.

PAMPLONA-SILVA MT, GONÇALVES LC, BITTENCOURT-OLIVEIRA M DO C, MARIN-MORALES MA. DNA damages induced by both endotoxin and exotoxin produced by cyanobacteria. **Chemosphere**, v. 254, 126716, 2020.

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, p. 1-9, 2019.

RAJPAL C, TOMAR PC. Effect of cadaverine on cultivars of tomato [*Lycopersicon esculentum* (L.) EM. Thell] under multiple stress. **Plant Archives**, v. 20, p. 1706–1709, 2020.

RODRIGUES, N. L. V. B. Testes de toxicidade aguda través de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos classe II A – Não inertes e classe II B – Inertes. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 8-16, 2007.

SCAVO, A.; ABBATE, C.; MAUROMICALE, G. Plant allelochemicals: agronomic, nutritional and ecological relevance in the soil system. **Plant and Soil**. p. 1-26, 2019.

SILVA, L. M. Cemitérios: fonte potencial de contaminação dos aquíferos livres. *In*: Congresso Latino Americano De Hidrologia Subterrânea, n. 4, 1998, Montevideo. **Memórias**. Montevideo: ALHSUD, 1998, v. 2, p. 667-681.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

SOBRAL, O.; MARIN-MORALES, M. A.; RIBEIRO, R. Could contaminant induced mutations lead to a genetic diversity overestimation? **Ecotoxicology**, v. 2, p. 838-846, 2013.

SOMMAGGIO, L. R. D.; MAZZEO, D. E. C.; SANT'ANNA, D. de A. e S.; LEVY, C. E.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 550-557, 2018.

SOUZA, C. P.; SOUZA, A. M. Funeral rituals in the process of mourning: meaning and functions. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 35, 2019. https://doi.org/10.1590/0102.3772e35412.

SOUZA, P. M. S.; SOMMAGIO, L. R. D.; MARIN-MORALES, M. A. PBAT biodegradable mulch films: Study of ecotoxicological impacts using *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and HepG2/C3A cell culture. **Chemosphere**, v. 256, p. 1-11, 2020.

TEDESCO S. B.; LAUGHINGHOUSE, I. V. H. D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: Srivastava JK, editor. **Environmental Contamination**. Rijeka: InTech Publisher, 2012. p. 137-56.

UNAL M, PALAVAN-UNSAL N, TUFEKCI MA. Effects of polyamines and polyamine biosynthetic inhibitors on mitotic activity of *Allium cepa* root tips. **Acta Biologica Hungarica**, v. 59, p. 93-102, 2008. https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.1.8.

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

WÓJCIK, W.; ŁUKASIEWICZ, M.; PUPPEL, K. Biogenic amines - formation, action and toxicity–review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 7, p. 2634-2640, 2020.

ZAGATTO, P. A. et al. Avaliação de toxicidade em sistema de tratamento biológico de afluentes líquidos. **Revista SABESP**, v. 166, p. 1-6, 1992.

6 ANEXOS

ANEXO 1 Média diária da precipitação do período de coleta do experimento de inumação da carcaça suína.

	Precipitação (mm)			
Dia da coleta	**Agosto (2019)**	**Setembro (2019)**	**Outubro (2019)**	**Novembro (2019)**
1	0	25,4	0	0
2	0	71,2	0	0
3	1,5	0,4	0	0
4	3,1	5,6	0	0
5	39,1	0	0	1,7
6	2,7	2	0	26
7	0	0	4,2	0
8	0	0	0,4	0,1
9	0	0	10,2	10,1
10	0	0	0,5	4,3
11	0	0	0	3,7
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0,1	11
15	0	0	0	4
16	0	0	0	1,7
17	0	0	0	0
18	0	0	0,5	0
19	0	0	17,6	0
20	2,6	0	0,2	0
21	0	3,1	0,2	1,5
22	0	0	2,7	0
23	0	0	1	13
24	0,5	0	0	6,3
25	0	2,7	0,1	0,1
26	0	2,7	0	0
27	0	0,4	0	0,2
28	0,3	0	24,2	23,4
29	0	0	0,1	0,2
30	0	0	2	0,1
31	0	*	6,7	*

Nota: Os valores destacados em vermelho correspondem às médias diárias de precipitação dos dias referentes às coletas das amostras de solo. Fonte: Agritempo, 2021.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresenta informações relevantes que sustentam a importância do estudo sobre a contaminação ambiental de cemitérios, bem como do produto gerado pela decomposição de corpos humanos (necrochorume) e das substâncias tóxicas presentes nesse líquido, conhecidas como aminas biogênicas. Este tipo de contaminação vem se destacando diante da comunidade científica, principalmente por comprometer a qualidade ambiental de ambientes terrestres, aquíferos superficiais e subterrânos, e por representar um risco em potencial à saúde humana.

Em nosso trabalho foi observado que os componentes presentes no necrochorume interferiram no desenvolvimento da raíz e hipocótilo em *L. sativa* e induziram aberrações cromossômicas e nucleares em *A. cepa*. Esses resultados reforçam a importância deste estudo no atual cenário de contaminação gerada por cemitérios em ambientes terrestres e aquáticos, uma vez que os efeitos tóxicos observados nos testes realizados indicam a presença de contaminantes hidrossolúveis nos extratos aquosos das amostras de solo. Entretanto, mais estudos são necessários para um melhor entendimento sobre o modo de ação e potencial tóxico do necrochorume em diferentes ecossistemas e organismos.

As aminas biogênicas presentes no necrochorume, também são formadas durante o processo putrefativo de alimentos, sendo consideradas substâncias de grande interesse na área de toxicologia alimentar. No entanto, nossos estudos mostraram que essas substâncias vem sendo estudadas em outras diferentes áreas de conhecimento, como a tafonomia e ciências forenses, onde são utilizadas principalmente como marcadores do processo de decomposição.

Esses trabalhos também reforçam a importância do desenvolvimento de técnicas eficazes para a quantificação e identificação dessas substâncias em diferentes áreas, que poderão auxiliar estudos de impactos ambientais promovidos pelos produtos gerados durante a decomposição cadavérica, bem como alertar para s possíveis consequências desta contaminação para a saúde humana.

8 REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; OMAR, B. Effect of carcass model on maggot distribution and thermal generation of two forensically important blowfly species, *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Chrysomya rufifacies* (Macquart). **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 8, n. 64, p. 1-8, 2018.

AHMAD, N. W.; LIM, L H.; DHANG, C. C.; CHIN, H. C.; ABDULLAH, A. G.; MUSTAFFA, W. N. W.; AZIRUN, S. M. Comparative insect fauna succession on indoor and outdoor monkey: Carrions in a semi-forested area in Malaysia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.1, n. 2, p. 232-238, 2011.

ALBUQUERQUE, H. N.; CEQUEIRA, J. S.; ALBUQUERQUE, I. C. S. Environmental impacts on public cemetery of Queimadas -PB, Brazil. **Espacios**, v. 38, n. 37, p. 10-24, 2017.

ALCÂNTARA, L. A.; SANTOS, S. A.; KEMERICH, P. D. C.; SILVA, R. F. Contaminação de recursos naturais por necrópoles. **Revista Disciplinarium Scientia**, v. 11, p. 17-28, 2010.

ALDERETE, B. L.; DA SILVA, J.; GODOI, R.; RABAIOLI DA SILVA, F.; TAFFAREL, S. R.; PISONI DA SILVA, L.; GARCIA, A. L. H.; JÚNIOR, H. M.; AMORIM, H. L. N.; PICADA, J. N. Evaluation of toxicity and mutagenicity of a synthetic effluent containing azo dye after Advanced Oxidation Process treatment. **Chemosphere**, v. 263, p. 1-10, 2020.

AL-MEKHLAFI, F. A.; ALAJMI, R. A.; ALMUSAWI, Z.; MOHAMMED A BD AL GALIL, F.; KAUR, P.; AL-WADAAN, M.; AL-KHALIFA, M. S. A study of insect succession of forensic importance: dipteran flies (Diptera) in two different habitats of small rodents in Riyadh City, Saudi Arabia. **Journal of King Saud University**, v. 32, n. 7, p. 3111-3118, 2020.

AL-MESBAH, H.; MOFFATT, C.; EL-AZAZY, O. M. E.; MAJEED, Q. A. H. The decomposition of rabbit carcasses and associated necrophagous Diptera in Kuwait. **Forensic Science International**, v. 217, n.1–3, p. 27–31, 2012.

ALMULHIM, A. M.; MENEZES, R. G. **Evaluation of postmortem changes**. Stat Pearls, Treasure Island, jan 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554464/> Acesso em: 21 nov. 2020.

AMORIM, Q. S. D.; CRUZ, C. F. Avaliação da contaminação de lençóis freáticos por necrochorume - Cachoeira - Bahia/Brasil. **Cientifico**, v. 14, n. 27, p. 107-120, 2014.

AMUNO, S. A. Potential ecological risk of heavy metal distribution in cemetery soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 224, n. 1435, jan 2013. Disponível em: < https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-013-1435-2#citeas> Acesso em: 16 set. 2020.

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 Journal**, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

BACIGALUPO, R. Cémitérios: fontes potenciais de impactos ambientais. **Revista História, Natureza e Espaço**, v. 1, p. 1-8, 2012.

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.

BARTON, P. S.; REBOLDI, A.; DAWSON, B. M.; UELAND, M.; STRONG, C.; WALLMAN, J. F. Soil chemical markers distinguishing human and pig decomposition islands: a preliminary study. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 16, p. 605-612, 2020.

BELK, A. D.; DEEL, H. L.; BURCHAM, Z. M.; KNIGHT, R.; CARTER, D. O.; METCALF, J. L. Animal models for understanding microbial decomposition of human remains. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 28, p. 117-125, 2019.

BELL, C. C.; DANKERS, A. C. A.; LAUSCHKE, V. M.; SISON-YOUNG, R.; JENKINS, R.; ROWE, C.; GOLDRING, C. E.; PARK, KEVIN, R.; SOPHIE, L.; WALKER, T.; SCHOFIELD, C.; BAZE, A.; FOSTER, A. J.; WILLIAMS, D. P.; VAN DE VEM, A. W. M.; JACOBS, F.; VAN HOUDT, J.; LÄHTEENMÄKI, T.; SNOEYS, J.; JUHILA, S.;

BONOMO, M. M.; MOROZESK, M.; DUARTE, I. D.; ROCHA, L. D.; FERNANDES, M. N.; MATSUMOTO, S. T. Sewage sludge hazardous assessment: chemical evaluation and cytological effects in CHO-k1 cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 11069-11075, 2016.

BORN, C. M.; OLIVEIRA, C. M. R.; CUBAS, S. A. Avaliação dos aspectos construtivos e vulnerabilidade das águas subterrâneas em áreas de cemitérios municipais de Curitiba (Paraná). **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n.32. p. 88-105, 2014.

BORNEMISSZA, G. F. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition of the soil fauna. **Australian Journal of Zoology**, v, 5, n. 1, p. 1-12, 1957.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n° 335, de 3 de abril de 2003. Dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama//legiabre.cfm?codlegi=359> Acesso em: 20 out. 2020.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n° 368 de 28 de março de 2006. Altera dispositivos da Resolução n° 335, de 3 de abril de 2003, que dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=488> Acesso em: 20 out. 2020.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n° 402 de 17 de novembro de 2008. Altera os artigos 11 e 12 da Resolução nº 335, de abril de 2003. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=590> Acesso em: 20 out. 2020.

BRIEGER, L. **Weitere untersuchungen über ptomaine**. Berlin: August Hirschwald, 1885, p. 39-43.

BROOKS, J. W. Postmortem changes in animal carcasses and estimation of the postmortem interval. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 5, p. 929-940, 2016.

BUŇKOVÁ, L.; BUŇKA, F.; KLČOVSKÁ, P.; MRKVIČKA, V.; DOLEŽALOVÁ, M. KRÁČMAR, S. Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 203-206, 2010.

BURDEN, N.; SEWELL, F.; CHAPMAN, K. Testing chemical safety: what is needed to ensure the widespread application of non-animal approaches? **PLOS Biology**, v. 13, n. 5, p. 1-8, 2015.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, v.426, n. 2, p. 211-214, 1999.

CABUGA JR, C. C.; ABELADA, J. J. Z.; APOSTADO, R. R. Q.; HERNANDO, B. J. H.; LADOR, J. E. C.; OBENZA, O. L. P.; PRESILDA, C. J. R.; HAVANA, H. C. *Allium cepa* test: An evaluation of genotoxicity. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 7, n. 1, p. 12-19, 2017.

CAŁKOSIŃSKI, I.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; OSTAPSKA, M.; DUDEK, K.; GAMIAN, A.; RYPUŁA, K. Microbiological analysis of necrosols collected from urban cemeteries in Poland. **BioMed Research International**, p. 1-7, 2015.

CAMARGO, C. E. O.; FERREIRA FILHO, A. W. P.; SALOMON, M. V. Temperature and ph of the nutrient solution on wheat primary root growth. **Agricultural Science**, v. 61, n. 3, p. 313-318, 2004.

CAMPOBASSO, C. P.; VELLA, G. D.; INTRONA, F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. **Forensic Science International**, v. 120, p. 18-27, 2001.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008.

CARTER, D. O.; TIBBET, M. Cadaver Decomposition and soil: Process. *In*: TIBBETT, M.; CARTER, D. O. **Soil analysis in forensic taphonomy: chemical and biological effects of buried human remains**. Boca Raton: CRC Press, 2008, p. 29-52.

CARTER, D. O.; YELLOWLEES, D.; TIBBETT, M. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. **Naturwissenschaften**, v. 94, n. 1, p.12-24, 2007.

CARTER, D. O.; YELLOWLEES, D.; TIBBETT, M. Temperature affects microbial decomposition of cadavers (*Rattus rattus*) in contrasting soils. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 129-137, 2008.

CASTRO, D. L. Caracterização geofísica e hidrogeológica do cemitério Bom Jardim, Fortaleza – CE. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 26, p. 251-271, 2008.

CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 253-272, 1992.

CESAR, R. G.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUZA, J. P.; COLONESE, J.; BIDONE, E.; CASTILHOS, Z.; EGLER, S.; POLIVANOV, H. Disposal of dredged sediments in tropical soils: ecotoxicological effects on earthworms. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 1487-1497, 2014.

CHANDRASEKARAN, A.; IDELCHIK, M. D. P. S.; MELENDEZ. J. A. Redox control of senescence and age-related disease. **Redox Biology**, v. 11, p. 91-102, 2017.

CHAN-KEB, C. A.; AGRAZ-HERNÁNDEZ, C. M.; PEREZ-BALAN, R. A.; GÓMEZ-SOLANO, M. I.; MALDONADO-MONTIEL, T. D. N. J.; AKE-CANCHE, B.; GUTIÉRREZ-ALCÁNTARA, E. J. Acute toxicity of water and aqueous extract of soils from Champotón river in *Lactuca sativa* L. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 593-597, 2018.

CHAPMAN, R. F.; SANKEY, J. H. P. The larger invertebrate fauna of three rabbit carcasses. **Journal of Animal Ecology**, v. 24, p. 394-402, 1955.

CHARLES, J.; SANCEY, B.; MORIN-CRINI, N.; BADOT, P. M.; DEGIORGI, F.; TRUNFIO, G.; CRINI, G. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2057-2064, 2011.

CHRISTENSEN, A. M.; PASSALACQUA, N. V.; BARTELINK, E. J. **Forensic Anthropology:** Current Methods and Practice. 1. ed. Amsterdam: Academic Press, 2014.

COE, M. The decomposition of elephant carcasses in the Tsavo (East) National Park, Kenya. **Journal of Arid Environments**, v. 1, n. 1, p. 71-86, 1978.

COOKE, M.; LEEVES, N.; WHITE, C. Time profile of putrescine, cadaverine, indole and skatole in human saliva. **Archives of Oral Biology**, v. 48, n. 4, p. 323-327, 2003.

CRUZ, T. M.; VASCONCELOS, S. D. Entomofauna de solo associada à decomposição de carcaça de suíno em um fragmento de mata atlântica de Pernambuco, Brasil. **Biociências**, v. 14, n. 2, p. 193-201, 2006.

DATTA, S.; SINGH, J.; SINGH, J.; SINGH, S.; SINGH, S. Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. **Sustainable Environment Research**, v. 28, n. 4, p. 171-178, 2018.

DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; LINARES, D. M.; LADERO, V.; RUAS-MADIEDO, P.; FERNANDEZ, M.; MARTIN, M. C.; ALVAREZ, M. A. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, v., 9, n. 120, p. 1-7, 2019.

DENT, B. B.; KNIGHT, M. J. A watery grave: the role of hydrogeology in cemetery practice. **Australian Cemeteries e Crematoria Association News**, v. 2, p. 19-22, 1995.

DEONIER, C. C. 1940. Carcass temperatures and their relation to winter blowfly populations and activity in the southwest. **Journal of Economic Entomology**, v. 33, p. 166-170, 1940.

DUARTE, D. M. Manaus entre o passado e o presente. Manaus: Edições Mídia Ponto Commp. 142-153, 2009.

EARLY, M.; GOFF, M. L. Arthropod succession patterns in exposed carrion on the island of O'ahu, Hawaiian Islands, USA. **Journal of Medical Entomology**, v. 23, n. 5, p. 520-31, 1986.

EKICI, K.; OMER, A. K. Biogenic amines formation and their importance in fermented foods. **BIO Web of Conferences**, v. 17, n. 232, p. 1-5, 2020.

EOM, I. C.; RAST, C.; VEBER, A. M.; VASSEUR, P. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 2, p.190-205, 2007.

EWART, L.; DEHNE, E. M.; FABRE, K.; GIBBS, S.; HICKMAN, J.; HORNBERG, E.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; JANG, K. J.; JONES, D. R.; LAUSCHKE, V. M.; MARX, U.; METTETAL, J. T.; POINTON, A.; WILLIAMS, D.; ZIMMERMANN, W. H.; NEWHAM, P. Application of microphysiological systems to enhance safety assessment in drug discovery. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 58, p. 65-82, 2018.

FEDDERN, V., MAZZUCO, H.; FONSECA, F. N.; DE LIMA, G. J. M. M. A review on biogenic amines in food and feed: toxicological aspects, impact on health and control measures. **Animal Production Science**, v. 59, n. 4, p. 608-618, 2019.

FENOGLIO, S.; BO, T.; CAMMARATA, M.; MALACARNE, G.; DEL FRATE, G. Contribution of macro- and micro-consumers to the decomposition of fish carcasses in low-order streams: an experimental study. **Hydrobiologia**, v. 637, n. 1, p. 219-228, 2010.

FIRBAS, P.; AMON, T. *Allium* chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 4, n. 4, p. 1-5, 2013.

FISKESJÖ, G. Benzo[a]pyrene and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in the *Allium test*. **Hereditas**, v. 95, p. 155-162, 1981.

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

FJÄLLBORG, B.; LI, B.; NILSSON, E.; DAVE, G. Toxicity identification evaluation of five metals performed with two organisms (*Daphnia magna* and *Lactuca sativa*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 196-204, 2005.

FORBES, S. L. Decomposition chemistry in a burial environment. *In*: TIBBETT, M.; CARTER, D. **Soil Analysis in Forensic Taphonomy**. New York: CRC Press, 2008, p. 203-217.

FUENTES, A.; LLORENS, M.; SAEZ, J.; AGUILAR, M. I.; ORTUNO, J. F.; MESSEGUER, V. F. Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilised sewage sludges. **Journal of Hazardous Materials**, v. 108, p. 161-169, 2004.

GALLOWAY, A. The process of decomposition: a model from the Arizona-Sonoran Desert. *In*: HAGLUND, W. D.; SORG, M. H. **Forensic taphonomy: the *post mortem* fate of human remains**. Boca Raton: CRC Press, 1997, p. 139-150.

GALLOWAY, A.; BIRKBY, W. H.; JONES, A. M.; HENRY, T. E.; PARKS, B. O. Decay rates of human remains in an arid environment. **Journal of Forensic Sciences**, v. 34, p. 607-616, 1989.

GOLDBERG, S.; KOZLOVSKY, A.; GORDON, D.; GELERNTER, I.; SINTOV, A.; ROSENBERG, M. Cadaverine as a putative component of oral malodor. **Journal of Dental Research**, v. 73, n. 6, p. 1168-1172, 1994.

GRANT, W. F. 1982. Chromosome aberration assays in allium: A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, 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. **Mutation Research**, v. 624, p. 107-112, 1999.

GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16, 2010.

HART, K.; AINSWORTH, D.; WILLIAMS, A. "Human taphonomy facility" Aka "The body farm". **Forensic Science & Criminal Investigation**, v. 5, n. 2, p. 1-3, 2017.

HAU, T. C.; HAMZAH, N. H.; LIAN, H. H.; HAMZAH, S. A. A. A. Decomposition process and *post mortem* changes: review. **Sains Malaysiana**, v. 43, n. 12, p. 1873-1882, 2014.

HOORNWEG, D.; BHADA-TATA, P.; KENNEDY, C. Environment: Waste production must peak this century. **Nature**, v. 502, p. 615-617, 2013.

IOAN, B. G.; MANEA, C.; HANGANU, B.; STATESCU, L.; GHEUCASOLOVASTRU, L.; MANOILESCU, I. The Chemistry decomposition in human corpses, **REVISTA DE CHIMIE**, v. 68, n. 6, p. 1352-1356, 2017.

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.

JANAWAY, R. C.; PERCIVAL, S. L.; WILSON, A. S. Decomposition of human remains. *In*: PERCIVAL, S. L. **Microbiology and Aging: Clinical Manifestations**. New York: Humana Press, 2009, p. 313-334.

JONKER, C.; OLIVIER, J. Mineral contamination from cemetery soils: case study of Zandfontein Cemetery, South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 2, p. 511-20, 2012.

KEIPER, J. B.; CHAPMAN, E. G.; FOOTE, B. A. Midge larvae (Diptera: Chironomidae) as indicators of *post mortem* submersion interval of carcasses in a woodland stream: a preliminary report. **Journal of Forensic Sciences**, v. 42, n. 6, p. 1074-1079, 1997.

KEMERICH, P. D. C.; BIANCHINI, D. C.; FANK, J. C.; BORBA, W. F.; WEBER, D. P.; UCKER, F. E. The environmental issue involving cemeteries in Brazil. **REMOA**, v. 13, n. 5, p. 3777-3785, 2014a.

KEMERICH, P. D. C.; BORBA, W. F.; GRAEPIN, C.; BARROS, G.; GERHARDT, A. E. Alterações químicas em solo ocupado por cemitério horizontal no norte do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 3, p. 85-99, 2014b.

KEMERICH, P. D. C.; UCKER, F. E.; BORBA, W. F. Cemitérios como fonte de contaminação ambiental. **Scientific American Brasil**, v. 1, p. 78-81, 2012.

KEOUGH, N.; MYBURGH, J.; STEYN, M. Scoring of Decomposition: A proposed amendment to the method when using a pig model for human studies. **Journal of Forensic Sciences**, v. 62, n. 4, p. 986-993, 2016.

KIM, M. S.; MIN, H. G.; KIM, J. G. Effects of phosphorus and iron on the phytotoxicity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in arsenic-contaminated soil. **Ecology and Resilient Infrastructure**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2018.

LECLUYSE, E. L.; WITEK, R. P.; ANDERSEN, M. E.; POWERS, M. J. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n. 6, p. 501-548, 2012.

LEE, H. L.; MARZUKI, T. Preliminary observation of arthropods in carrion and its application to forensic entomology in Malaysia. **Tropical Biomedicine**, v. 10, n. 1, p. 5-8, 1993.

LEE, S.; SHIN, J.; SUNG, N.; KIM, J.; HOTCHKISS, J. Effect of cooking on the formation of N-nitrosodimethylamine in Korean dried seafood products. **Food Additives & Contaminants**, v. 20, p. 31-36, 2003.

LELI, I. T.; ZAPAROLI, F. C. M.; SANTOS, V. C.; OLIVEIRA, M.; REIS, F. A. G. V. Estudos ambientais para cemitérios: indicadores, áreas de influência e impactos ambientais. **Boletim de Geografia**, v. 30, n. 1, p. 45-54, 2012.

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

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LOZANO, J. G.; DALLA COSTA, C. A. M.; LABADESSA, A. S. As consequências sanitárias ocorridas pela contaminação do lençol freático por necrochorume: um estudo de caso no cemitério São Sebastião em Ariquemes-RO. **Revista Fiar: Revista do Núcleo de Pesquisa e Extensão**, v. 1 n. 1, p. 17-39, 2012.

LUTTERBECK, C. A.; KERN, D. I.; MACHADO, Ê. L.; KÜMMERER, K. Evaluation the toxic effects of four anti-cancer drugs in plant bioassays and its potency for screening in the context of waste water reuse for irrigation. **Chemosphere**, v. 135, p. 403-410, 2015.

LYU, J.; PARK, J.; KUMAR PANDEY, L.; CHOI, S.; LEE, H.; DE SAEGER J.; DEPUYDT, S.; HAN, T. 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 the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. **Mutation Research**, v. 429, n. 2, p. 103-106, 1999.

MALUSZYNSKA, J.; JUCHIMIUK, J. Plant genotoxicity: A molecular cytogenetic approach in plant bioassays. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 56, p. 177-184, 2005.

MARIN-MORALES, M. A.; HOSHINA, M. M.; HARA, R. Q.; SOMMAGGIO, L. R. D. Ecogenotoxicity in aquatic systems. *In*: POLONINI, H.; BRAYNER, R. **Aquatic Toxicology**. Foster city: OMICS Group eBooks, 2016, p. 1-19.

MATUSZEWSKI, S.; HALL, M. J. R.; MOREAU, G.; SCHOENLY, K. G.; TARONE, A. M.; VILLET, M. H. Pigs vs people: the use of pigs as analogues for humans in forensic entomology and taphonomy research. **International Journal of Legal Medicine**, v. 134, p. 793-810, 2020.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, p. 162-171, 2014.

METCALF, J. L.; XU, Z. Z.; WEISS, S.; LAX, S.; TREUREN, W. V.; HYDE, E. R.; SONG, S. J.; AMIR, A.; LARSEN, P.; SANGWAN, N.; HAARMANN, D.; HUMPHREY, G. C.; ACKERMANN, G.; THOMPSON, L. R.; LAUBER, C.; BIBAT, A.; NICHOLAS, C.; GEBERT, M. J.; PETROSINO, J. F.; REED, S. C.; GILBERT, J. A.; LYNNE, A. M.; BUCHELI, S. R.; CARTER, D. O.; KNIGHT, R. Microbial community assembly and

metabolic function during mammalian corpse decomposition. **Science**, v. 351, n. 6269, p. 158-162, 2016.

MIGLIORINI, R. B. **Cemitérios como fonte de poluição de aqüífero: estudo do cemitério Vila Formosa na bacia sedimentar de São Paulo**. Instituto de Geociências, São Paulo, SP: USP, 1994. 77 p. Dissertação (Mestrado).

MILLER, E. R.; ULLREY, D. E. The pig as a model for human nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 361-382, 1987.

MONTEIRO, M. S.; LOPES, T.; MANN, R. M.; PAIVA, C.; SOARES, A. M. V. M.; SANTOS, C. Microsatellite instability in *Lactuca sativa* chronically exposed to cadmium. **Mutation Research**, v. 672, n. 2, p. 90-94, 2009.

NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P.; MEERDINK, G. Control of Biegonic amines in food – existing and emerging approaches. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 139-150, 2010.

NECKEL, A.; COSTA, C.; MARIO, D. N.; SABADIN, C. E. S.; BODAH, E. T. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. **Revista Brasileira de Gestão Urbana**, v. 9, n. 2, p. 216-230, 2017.

NECKEL, A.; GONÇALVES JUNIOR, A. C.; RIBEIRO, L. A.; SILVA, C.; CARDOSO, G. T. Cemeteries heavy metals concentration analysis of soils and the contamination risk for the surrounding resident population. **Journal of Engineering Research and Application**, v. 6, n. 6, p. 30-35, 2016.

NECKEL, A.; KORCELSKI, C.; KUJAWA, H. A.; SCHAEFER DA SILVA, I.; PREZOTO, F.; WALKER AMORIN, A. L.; MACULAN, L. S.; GONÇALVES, A. C.; BODAH, E. T.; BODAH, B. W.; DOTTO, G. L.; SILVA, L. F. O. Hazardous elements in the soil of urban cemeteries; constructive solutions aimed at sustainability. **Chemosphere**, v. 262, p. 1-13, 2020.

NEIRA, D. F.; TERRA, V. M.; PRATTE-SANTOS, R.; BARBIÉRI, R. S. Impactos do necrochorume nas águas subterrâneas do cemitério de Santa Inês, Espírito Santo, Brasil. **Natureza On Line**, v. 6, p. 36-41, 2008.

NIBOURG, G. A.; CHAMULEAU, R. A.; VAN GULIK, T. M.; HOEKSTRA, R. Proliferative human cell sources applied as biocomponent in bioartificial livers: a review. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 7, p. 905-21, 2012.

NOLAN, A. N.; MEAD, R. J.; MAKER, G.; BRINGANS, S.; CHAPMAN, B.; SPEERS, S. J. Examination of the temporal variation of peptide content in decomposition fluid under controlled conditions using pigs as human substitutes. **Forensic Science International**, v. 298, p. 161-168, 2019.

NUÑEZ, M.; DEL OLMO, A.; CALZADA, J. Biogenic Amines. **Encyclopedia of Food and Health**, v. 1, p. 416-423, 2016.

ODO, P. E.; ILOBA, B. N. Forensic Entomology: an inventory of Arthropods collected on the decomposing pig Carrions during the dry season in Warri, Southern Nigeria. **International Research Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 4, p. 277-285, 2020.

OECD. **OECD guidelines for testing of chemicals**: guideline 208, terrestrial plants, growth test. Paris, 1984.

OLIVEIRA, B.; QUINTEIRO, P.; CAETANO, C.; NADAIS, H.; ARROJA, L.; FERREIRA DA SILVA, E.; SENOS MATIAS, M. Burial grounds' impact on groundwater and public health: an overview. **Water and Environment Journal**, v. 27, p. 99-106, 2013.

PACHECO, A. Cemitérios e meio ambiente. Instituto de Geociências, São Paulo, SP: USP, 2000. 105 p. (Tema de livre docência).

PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M.; DOS SANTOS, G. L.; DAVIDE, L. C. Cytotoxicity of Spent Pot Liner on Allium cepa root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 9, n. 133, p. 442-447, 2016.

PANDARD, P.; DEVILLERS, J.; CHARISSON, A. M.; POULSEN, V.; JOURDAN, M. J.; FÉRARD, J. F.; GRAND, C.; BISPOI, A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment**, v. 363, p. 114-125, 2006.

PARK, J.; YOON, J. H.; DEPUYDT, S.; OH, J. W.; JO, Y. M.; KIM, Y.; BROWN, M. T.; HAN, T. The sensitivity of a 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, p. 1-9, 2019.

PAYNE, J. A. A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. **Ecology**, v. 46, p. 592-602, 1965.

PINHEIRO, J. Decay process of a cadáver. *In*: SCHMITT, A.; CUNHA E.; PINHEIRO, J. **Forensic Anthropology and Medicine**. Totowa: Humana Press, 2006, p. 85-116.

PINHEIRO, T. M. Contaminação ambiental causada pelo necrochorume proveniente de cemitérios. **INOVAE**, v. 6, p. 145-171, 2018.

PROBST, C.; GETHMANN, J.; LUTZ, L.; TEIFKE, J. P.; CONRATHS, F. J. Estimating the postmortem interval of wild boar carcasses. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 6, p. 1-22, 2020.

QUINTON, J. M.; ÖSTBERG, J.; DUINKER, P. N. The influence of cemetery governance on tree management in urban cemeteries: A case study of Halifax, Canada and Malmö, Sweden. **Landscape and Urban Planning**, v. 194, 2020.

RABIE, M. A.; ELSAIDY, S.; EL-BADAWY, A. A.; SILIHA, H.; MALCATA, F. X. Biogenic amine contents in selected egyptian fermented foods as determined by ion-exchange chromatography. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 4, p. 681-685, 2011.

REDDY, K.; LOWENSTEIN, E. J. Forensics in dermatology: part I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 5, p. 801-808, 2011.

REED, H. B. JR. A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to insects. **American Midland Naturalist Journal**, v. 59, p. 213-245, 1958.

REEVES, N. M. Taphonomic effects of vulture scavenging. **Journal of Forensic Sciences**, v. 54, n. 3, p. 523-528, 2009.

ROMANÓ, E. N. L. **Cemitérios: Passivo Ambiental, Medidas Preventivas e Mitigadoras**. Ponta Grossa: Instituto Ambiental do Paraná. 2010. Disponível em: <http://docplayer.com.br/13790105-Cemiterios-passivo-ambientalmedidas-preventivas emitigadoras.html> Acesso em: 22 nov. 2020.

RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A. M. Impact of biogenic amines on food quality and safety. **Foods**, v. 8, n. 2, p. 62-78, 2019.

RUMIZA, A. R.; KHAIRUL, O.; ZUHA, R. M.; HEO, C. C. An observation on the decomposition process of gasoline-ingested monkey carcasses in a secondary forest in Malaysia. **Tropical Biomedicine**, v. 27, n. 3, p. 373-383, 2010.

SÁNCHEZ-MACÍAS, D.; CEVALLOS, L.; NÚÑEZ, D.; MORALES-DELANUEZ, A. First report of postmortem pH evolution and *rigor mortis* in guinea pigs. **Livestock Science**, v. 229, p. 22-27, 2019.

SANTOS, A. G. S.; MORAES, L. R. S.; NASCIMENTO, S. A. M. Qualidade da água subterrânea e necrochorume no entorno do cemitério do Campo Santo em Salvador-BA, Brasil. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais**, v. 3, n. 1, p. 39-60, 2015.

SCHOENLY, K. G.; HASKELL, N. H.; MILLS, D. K.; BIEME-NDI, C.; LARSEN, K.; LEE, Y. Recreating death's acre in the school yard: using pig carcasses as model corpses to teach concepts of forensic entomology and ecological succession. **American Biology Teacher**, v. 68, p. 402-410, 2006.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SHEAN, B. S.; MESSINGER, L.; PAPWORTH, M. Observations of differential decomposition on sun exposed v. shaded pig carrion in coastal Washington State. **Journal of Forensic Sciences**, v. 38, p. 938-949, 1993.

SHEAN, B. S.; MESSINGER, L.; PAPWORTH, M. Observations of differential decomposition on sun exposed vs. shaded pig carrion in coastal Washington State. **Journal of Forensic Sciences**, v. 38, n. 4, p. 938-949, 1993.

SILAHUDDIN, S. A.; LATIF, B.; KURAHASHI, H.; WALTER, D. E.; HEO, C. C. The importance of habitat in the ecology of decomposition on rabbit carcasses in Malaysia: implications in forensic entomology. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 1, p. 9-23, 2015.

SILVA, C. M. G.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines in chickenbreast and thigh after slaughter and during storage at 4 +/- 1 °C and in chicken-based meat products. **Food Chemistry**, v. 78, p. 241-248, 2002.

SILVA, L. M. Cemitérios: fonte potencial de contaminação dos aquíferos livres. **Revista Saneamento Ambiental**, n. 71, p. 41-45, 2000.

SILVA, L. M. Cemitérios: fonte potencial de contaminação dos aquíferos livres. *In*: Congresso Latino Americano De Hidrologia Subterrânea, n. 4, 1998, Montevideo. **Memórias**. Montevideo: ALHSUD, 1998, v. 2, p. 667-681.

SILVA, R. W. C.; MALAGUTTI FILHO, W. Emprego do imageamento elétrico no estudo da contaminação por cemitérios. **Revista de Geociências**, v. 29, n. 3, p. 343-354, 2010.

SILVA, R.; MALAGUTTI FILHO, W. Cemitérios como áreas potencialmente contaminadas. **Brazilian Journal of Environmental Sciences**, n. 09, p. 26-35, 2008.

SILVA, R.B.P.; CAMPOS, M.C.C.; SILVA, L.S.; FILHO, E.G.B.; LIMA, A.F.L.; PINHEIRO, E.N.; CUNHA, J.M. Concentration of Heavy Metals in Soils under Cemetery Occupation in Amazonas, Brazil, **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 29, n. 2, p. 192-208, 2020.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

SINGH, N.; BALA, M. Succession study on forensically important Coleoptera from India: a preliminary study and its forensic implications. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

SIROCCHI, V.; CAPRIOLI, G.; CECCHINI, C.; COMAN, M.M.; CRESCI, A.; MAGGI, F.; PAPA, F.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; SAGRATINI, G. Biogenic amines as freshness index of meat wrapped in a new active packaging system formulated with essential oils of Rosmarinus officinalis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 8, p. 921-928, 2013.

SISON-YOUNG, R. L.; LAUSCHKE, V. M.; JOHANN, E.; ALEXANDRE, E.; ANTHERIEU, S.; AERTS, H.; GERETS, H. H. J.; LABBE, G.; HOËT, D.; DORAU, M.; SCHOFIELD, C. A.; LOVATT, C. A.; HOLDER, J. C.; STAHL, S. H.; RICHERT, L.; KITTERINGHAM, N. R.; JONES, R. P.; ELMASRY, M.; WEAVER, R. J.; HEWITT, P. G.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; GOLDRING, C. E.; PARK, B. K. A multicenter assessment of single-cell models aligned to standard measures of cell health for prediction of acute hepatotoxicity. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1385-1400, 2017.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium test* procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 368, p. 171-179. 1996.

SMITH, T. A. Polyamines. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 117-143, 1985.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. *In*: ROMERO, P. R.; CANTÚ, A. M. **Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México**. 1. ed. México: Instituto Nacional de Ecología, 2008, p. 55-67.

SOHAL, R. S.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 575-586, 2002.

SOMMAGGIO, L. R. D.; MAZZEO, D. E. C.; SANT' ANNA, D. de A. e S.; LEVY, C. E.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 550-557, 2018.

SOUZA, P. M. S.; SOMMAGGIO, L. R. D.; MARIN-MORALES, M. A.; MORALES, A. R. PBAT biodegradable mulch films: Study of ecotoxicological impacts using *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and HepG2/C3A cell culture. **Chemosphere**, v. 256, 2020.

STADLER, L. J. Genetic effects of X-rays in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 14, p. 69-75, 1928.

STADLER, S.; STEFANUTO, P. H.; BROKL, M.; FORBES, S. L.; FOCANT, J. F. Characterization of volatile organic compounds from human analogue decomposition using thermal desorption coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 998-1005, 2013.

STATHEROPOULOS, M.; SPILIOPOULOU, C.; AGAPIOU, A. A study of volatile organic compounds evolved from the decaying human body. **Forensic Science International**, v. 153, n. 2-3, p. 147-155, 2005.

SUDALAIMANI, S.; ESOKKIYA, A.; HANSDA, S.; SURESH, C.; TAMILARASAN, P.; GIRIBABU, K. Colorimetric sensing of putrescine and cadaverine using ninhydrin as a food spoilage detection reagent. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 629–636, 2020.

SUN, H.; WEI, Y.; DENG, H.; XIONG, Q.; LI, M.; LAHIRI, J.; FANG, Y. Label-free cell phenotypic profiling decodes the composition and signaling of an endogenous ATP-sensitive potassium channel. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-11, 2014.

SUTHERLAND, A.; MYBURGH, J.; STEYN, M.; BECKER, P. J. The effect of body size on the rate of decomposition in a temperate region of South Africa. **Forensic Science International**, v. 231, n. 1-3, p. 257-262, 2013.

SZELECZ, I.; KOENIG, I.; SEPPEY, C. V. W.; LE BAYON, R. C.; MITCHELL, E. A. D. Soil chemistry changes beneath decomposing cadavers over a one-year period. **Forensic Science International**, v. 286, p. 155-165, 2018.

TESHIKA, J. D.; ZAKARIYYAH, A. M.; TOORABALLY, Z.; ZENGIN, G.; RENGASAMY, K. R.; PANDIAN, S. K.; MAHOMOODALLY, F. M. Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, p. 1-75, 2019.

TIGRE, R. C.; SILVA, N. H.; SANTOS, M. G.; HONDA, N. K.; 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.

TIMOTHY, O.; IDU, M.; OLORUNFEMI, D.; OVUAKPORIE-UVO, O. Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv. **South African Journal of Botany**, v. 91, p. 71-74, 2014.

TSANGARIS, C.; VERGOLYAS, M.; FOUNTOULAKI, E.; GONCHARUK, V. V. Genotoxicity and oxidativ estress biomarkers in Carassius gibelio as endpoints for toxicity testing of Ukrainian polluted river waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 8, p. 2240-2244, 2011.

ÜÇISIK AS, RUSHBROOK P. **The impact of cemeteries on the environment and public health: an introductory briefing**. Copenhagen, Denmark: World Health Organization, Regional Office for Europe; 1998. 11p.

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

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic

environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178-189, 2006.

VAN DER WORP, H. B.; HOWELLS, D. W.; SENA, E. S.; PORRITT, M. J.; REWELL, S.; O'COLLINS, V.; MACLEOD, M. R. Can animal models of disease reliably inform human studies? **PLOS Medicine**, v. 7, n. 3, p. 1-8, 2010.

VARLET, V.; JOYE, C.; SHARI, L.; FORBES, S. I. L.; GRABHERR, S. Revolution in death sciences: body farms and taphonomics blooming. A review investigating the advantages, ethical and legal aspects in a Swiss context. **International Journal of Legal Medicine**, v. 134, n. 5, p. 1875-1895, 2020.

VASS, A. A.; BARSHICHK, S. A.; SEGA, G., CATON, J.; SKEEN, J. T.; LOVE, J. C.; SYNSTELIEN, J. A. Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. **Forensic Science International**, v. 47, n. 3, p. 542-553, 2002.

VASS, A. A.; BASS, W. M.; WOLT, J. D.; FOSS, J. E.; AMMONS, J. T. Time since death determinations of human cadavers using soil solution. **Journal of Forensic Sciences**, v. 37, n. 5, p. 1236-1253, 1992.

VASS, A. A.; SMITH, R. R.; THOMPSON, C. V.; BURNETT, M. N.; DULGERIAN, N.; ECKENRODE, B. A. Odor analysis of decomposing buried human remains. **Journal of Forensic Sciences**, v. 53, n. 2, p. 384-391, 2008.

VAZ CRIPPA, G.; ZANETTI, T. A.; BIAZI, B. I.; BARANOSKI, A.; MARQUES, L. A., COATTI, G. C.; LEPRI, S. R.; MANTOVANI, M. S. Up and down-regulation of mRNA in the cytotoxicity and genotoxicity of Plumbagin in HepG2/C3A. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 75, p. 1-10, 2020.

WANG, M.; CHU, J.; WANG, Y.; LI, F.; LIAO, M.; SHI, H.; ZHANG, Y.; HU, G.; WANG, J. Forensic entomology application in China: Four case reports. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 63, p. 40-47, 2019.

WESCOTT, D. J. Recent advances in forensic anthropology: decomposition research. **Forensic Sciences Research**, p. 1-16, 2018.

WIDYA, M.; MOFFATT, C.; SIMMONS, T. The formation of early stage adipocere in submerged remains: a preliminary experimental study. **Journal of Forensic Sciences**, v. 57, n. 2, p. 328-333, 2012.

WILKE, B. M.; RIEPERT, F.; KOCH, C.; KÜHNE, T. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 283-293, 2008.

WITT, I.; CASSELLA, J. The feasibility of a United Kingdom Human Taphonomic Research Centre (UKHTRC). In: **The feasibility of a United Kingdom human taphonomic research centre (UKHTRC)**. Blurb Books, 2015, p. 1-88. Disponível em: http://www.blurb.co.uk/b/6632826-the-feasibility-of-a-united-kingdom-human-taphonom. Acesso em 22 de jul. de 2021.

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

WRZESINSKI, K.; MAGNONE, M. C.; HANSEN, L. V.; KRUSE, M. E.; BERGAUER, T.; BOBADILLA, M.; GUBLER, M.; MIZRAHI, J.; ZHANG, K.; ANDREASEN, C. M.; JOENSEN, K. E.; ANDERSEN, S. M.; OLESEN, J. B.; MUCKADELLG, O. B. S.; FEY, S. J. HepG2/C3A 3D spheroids exhibit stable physiological functionality for at least 24 days after recovering from trypsinisation. **Toxicology Research**, v. 2, p. 163-172, 2013.

YADAV, A.; RAJ, A.; PURCHASE, D.; FERREIRA, L. F. R.; SARATALE, G. D.; BHARAGAVA, R. N. Phytotoxicity, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of organic and inorganic pollutants rich tannery wastewater from a Common Effluent Treatment Plant (CETP) in Unnao district, India using *Vigna radiata* and *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 224, p. 324-332, 2019.

YANG, H.; MA, M.; THOMPSON, J. R.; FLOWER, R. J. Waste management, informal recycling, environmental pollution and public health. **Journal of Epidemiology and Community Health**, p. 1-7, 2017.

YANG, X. C.; HAN, Z. Z.; RUAN, X. Y.; CHAI, J.; JIANG, S. W.; ZHENG, R. Composting swine carcasses with nitrogen transformation microbial strains: Succession of

microbial community and nitrogen functional genes. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 555-566, 2019.

ZHANG, Q.; WIDMER, G.; TZIPORI, S. A pig model of the human gastrointestinal tract. **Gut Microbes**, v. 4, p. 193-200, 2013.