

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE RESÍDUOS DE DEGRADAÇÃO EM SOLO, DE FILMES PARA EMBALAGENS CONSTITUIDOS DE BIOPOLÍMEROS

1. INTRODUÇÃO

Os polímeros por definição são macromoléculas que se caracterizam por sua estrutura química e as suas relações inter e intramoleculares, possuindo unidades químicas denominadas monômeros, interagindo por ligação covalente. Apesar dos polímeros sintéticos conquistarem, aos poucos, seu espaço como material de grande importância para a sociedade atual, seu descarte é ainda um problema mundial, e principalmente para o Brasil. Sua baixíssima degradabilidade, na maioria dos casos, e o elevado volume de produção fazem com que seus rejeitos ocupem uma grande área por longos períodos, prejudicando a vida útil dos aterros sanitários. Além da toxicidade para o meio ambiente com a sua degradação lenta, a disposição final de polímeros plásticos é extremamente complicada uma vez que para alguns polímeros, não é possível usar do método de incineração pelos altos preços de fornos e pela toxicidade de produtos gerados (KARLSSON *et al*, 1998; CRUZ *et al*, 2008).

Além disso, há grandes impactos ambientais causados pelos processos de extração e refino utilizados para produção dos polímeros provenientes do petróleo, a escassez do petróleo e o aumento do seu preço são alguns fatores que estão diretamente relacionados ao crescente interesse pelos biopolímeros. Os biopolímeros ou bioplásticos têm a estrutura similar à de plástico extraído de combustível fóssil, entretanto possuem a base biológica ou biodegradável, podendo, também, apresentar as duas características, como o PLA (poliácido láctico), PHA (Polihidroxialcanoatos), e polissacarídeos que são biobaseados e biodegradáveis. Materiais de base biológica são totais ou parcialmente derivados de fontes renováveis; A biodegradabilidade de um material depende da sua estrutura química, e, sendo assim, um material de base totalmente biológica não necessariamente é biodegradável, alguns polímeros biodegradáveis são o PBAT (Poliadipato-co-tereftalato de butileno), PBS (Polibutileno succinato) e o PCL (Policaprolactona). Então, existem possíveis benefícios da substituição de produtos fósseis por produtos de base biológica com relação a sustentabilidade e sua matriz, porém, ainda deve ser analisado os possíveis efeitos destes produtos em relação ao meio ambiente (BRITO *et al*, 2011; FORTUNA, 2020).

Os vegetais superiores (plantas traqueófitas) apresentam características que tornam excelentes modelos genéticos para avaliação de poluentes ambientais, por isso têm sido utilizados com muita frequência em estudos de monitoramento. A espécie *Allium cepa* (cebola) constitui uma das espécies pioneiras nos estudos de aberrações cromossômicas causadas pela ação de agentes físicos e químicos, devido à sua característica cinética de proliferação pelo crescimento rápido das raízes, pelo número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo e sua disponibilidade durante o ano inteiro, por seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em números reduzidos ($2n = 16$) e de grande tamanho (GRANT, 1982; GRANT, 1994; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO *et al*, 2006).

O bioensaio utilizando sementes de cebola (*Allium cepa*) é amplamente utilizado como método de avaliação ecotoxicológico dos impactos ambientais de substâncias puras ou misturas complexas, como é o caso de grande parte das amostras ambientais, sendo muito efetiva em inseticidas, herbicidas, metais pesados, derivados de petróleo, corantes e aditivos alimentares. Este ensaio tem baixo custo de execução e utiliza um modelo que é suficientemente sensível para detectar inúmeras alterações cromossômicas provocadas por substâncias ou mistura delas, nas células em divisão (VENTURA *et al*, 2004; MATSUMOTO *et al*, 2006; TÜRKOGLU, 2006; BIANCHI, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; COSTA, 2010).

O teste de fitotoxicidade serve para determinar se uma amostra contém elementos que possam inibir a germinação de sementes, o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Já o teste de genotoxicidade, possibilita avaliar os efeitos genotóxicos, ou danos ao DNA, por meio da contagem de alterações nos cromossomos nas várias fases do ciclo celular, chamadas de aberrações cromossômicas, que também é utilizado para a investigação dos mecanismos de ação dos agentes testados, sejam testes com substâncias puras ou misturas complexas, ele é largamente usado para o monitoramento ocupacional e ambiental como um biomarcador de efeitos induzidos por carcinógenos (HAGMAR *et al*, 2004; OLESZCZUK *et al*, 2011; VALENTE *et al*, 2017). Para analisar efeitos mutagênicos, é registrada a ocorrência de micronúcleos (MN), que são gerados a partir de quebras ou perdas de cromossomos, na fase de divisão celular, na qual o material genético dentro do núcleo replica-se, podendo ocorrer erros que levam a danos no DNA, sendo visualizados nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém de tamanho reduzido (MARIN-MORALES, 2008; MACAGNAN *et al*, 2009).

2. METODOLOGIA

2.1. Amostras

As amostras do biorresíduo resultantes da desintegração dos filmes laminados no solo de compostagem, contendo os produtos desta degradação foram solubilizadas, seguindo a proporção de 200 g de massa – base seca – de biorresíduo para 800 mL de água, com base na norma NBR ABNT 10006:2004. As soluções foram submetidas à agitação por 5 minutos em agitador mecânico de haste com hélice (modelo NI-1137 da marca Nova Instruments) e mantidas em repouso por sete dias à temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram filtradas a vácuo por membrana de filtração com porosidade de 0,45µm e diâmetro de 47 mm (marca Membra Filtrante MCE) e acondicionadas em uma geladeira. Nesta etapa as amostras laminadas foram compostas por resíduos de: Amostra 1 - PBS (Polibutileno succinato), NatureFlex™ 25NK Matt e NatureFlex™ 20 NKME metalizado; Amostra 2 - NatureFlex™ 25NK Matt, NatureFlex™ 20 NKME metalizado e blenda de PBAT/PHBH.

2.2. Bioensaio da A. cepa como organismo de teste

Cem sementes de *Allium cepa* foram colocadas em placas de Petri com papel filtro, embebido com 4 mL de Amostra 1 - PBS (Poli butileno succinato), NatureFlex™ 25NK Matt e NatureFlex™ 20 NKME metalizado; Amostra 2 - NatureFlex™ 25NK Matt, NatureFlex™ 20 NKME metalizado e blenda de PBAT/PHBH; EMS 4.10⁻⁴M (etano metil-sulfonato) como controle positivo; e água destilada, como controle negativo. As placas foram envolvidas em filme plástico e deixadas por cinco dias em local escuro. As raízes agora com aproximadamente 2 cm de comprimento foram coletadas, contadas e fixadas no fixador Carnoy (Etanol:Ácido Acético 3:1) e após 24 horas, foram transferidas para tubos falcon contendo álcool 70% até o momento de da hidrólise das raízes. Após 72 h as raízes foram retiradas dos frascos com o fixador e colocadas em um béquer para o processo de hidrólise, realizada com HCl 1N a 60°C em banho-maria, por 10 minutos. Após a hidrólise as raízes foram colocadas em frascos de vidro âmbar, contendo o reagente Schiff, onde ficam por duas horas em local escuro. Após o processo, as raízes foram lavadas em água destilada ao menos três vezes, até que o excesso de corante fosse retirado. Sobre uma lâmina, coloca-se uma raiz com meristema intacto (porção terminal corada com roxo mais intenso) e com auxílio de um bisturi corta-se apenas a porção meristemática de 1 mm acima da coifa, sobre a qual é adicionada uma gota de corante Carmim e coberto com uma lamínula. Pressiona-se o material com auxílio

de um lápis com o lado da borracha de apagar, até que as células sejam completamente esmagadas. Para leitura, as células são contadas na objetiva de 40X, 500 células por lâmina e cinco lâminas por tratamento (2500 células). Foram considerados os “*end points*”: índice micronúcleos (MN), índice mitótico e morte celular. Os grupos foram comparados pelo teste estatístico ANOVA *one-way*, com pós-teste de Tukey e intervalo de confiança de 95%.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Biopolímeros e Biodegradação

A obtenção dos biopolímeros e dos polímeros biodegradáveis (natural e sintético) surge como uma opção para ampliar a solução dos problemas decorrentes da poluição ambiental, devido à quantidade significativa de materiais poliméricos que não são biodegradáveis. Portanto, a aplicação dos polímeros biodegradáveis vem como uma tendência para o desenvolvimento socioeconômico e preservação ambiental (MEDEIROS; LIMA, 2020).

Bioplásticos eram inicialmente usados durante o século XIX apenas para embalar doces e, portanto, seu uso não é novo. Eles têm origem de fontes biológicas e são denominados de biopolímeros, polímeros verdes e os polímeros recicláveis para embalagens de bebidas, alimentos, inibidores de vetores virais e bacterianos, entre os biopolímeros são biodegradáveis, e se decompõem com menos tempo do que os polímeros sintéticos, eles se degradam pela ação de microorganismos e possuem propriedades semelhantes entre si. Os polímeros biodegradáveis podem ser derivados de fontes naturais renováveis como, por exemplo, o milho, celulose, batata e cana de açúcar e podem ser potenciais substitutos para polímeros derivados do petróleo como uma solução para o crescente acúmulo no meio ambiente (BRITO *et al*, 2011). Possuem viabilidade econômica e reais possibilidade de implementação no mercado e na sociedade atual. Atualmente está sendo dada muita ênfase à preservação e conservação do meio ambiente como forma de garantir um desenvolvimento sustentável. Entre os diversos danos causados ao meio ambiente, um está relacionado com os resíduos plásticos (HIPOLITO; HIPOLITO; LOPES, 2013).

A biodegradação é um processo natural pelo qual compostos orgânicos são convertidos em compostos mais simples, mineralizados e redistribuídos através de ciclos elementares como o do carbono, nitrogênio e enxofre. Quando em ambientes

biologicamente ativos, polímeros biodegradáveis são consumidos por agentes biológicos, tais como fungos e bactérias, e utilizados como alimentos, eliminando quaisquer resíduos perigosos ou tóxicos para o meio ambiente (ASSIS, 2009; FONSECA, 2014).

3.2. Biopolímeros e Embalagens

Considerando que o uso de polímeros como embalagens para produtos alimentícios é consolidado, e que a deposição de seus resíduos tem crescido substancialmente, biopolímeros como alternativa aos plásticos sintéticos também merecem atenção. Algumas vantagens dos polímeros biodegradáveis seriam a produção em escala industrial, pois, o Brasil é um grande produtor de milho, batata e cana de açúcar. Estes polímeros possuem boa resistência mecânica, e o tempo de degradação é outra vantagem deste tipo de material, pois é mais rápido em comparação com plásticos tradicionais (FECHINI, 2013). Além disso, constituem um campo em desenvolvimento, com crescente utilização não só para embalagens, bem como para os mais variados setores, se tornando uma área de grande potencial de estudos de viabilidade em diversos sistemas produtivos. No entanto, dificuldades devem ser superadas, para uma maior utilização destes polímeros, que no Brasil ainda é muito baixa, além do seu custo, quando comparado aos das resinas tradicionais (LANDIM *et al*, 2016).

O presente trabalho faz parte de um projeto mais amplo para desenvolvimento de embalagem laminada a partir de bioplásticos, conduzido pela empresa Oeko Biopolímeros, que em parceria com a empresa Plascon, produziu os filmes de PBS e de PBAT/PHBH, os quais foram, posteriormente, utilizados pela empresa Peeqflex para produzir as amostras laminadas com os filmes NatureFlex™ transparente e NatureFlex™ metalizado, estes últimos produzidos e fornecidos pela empresa Futamura. O produto deste trabalho vem de encontro à crescente demanda do mercado de embalagens, aliando boas características de conservação de alimentos com propriedades ambientalmente amigáveis.

3.3. Bioindicadores de Ecotoxicidade

Os bioindicadores são organismos de qualquer natureza que podem ser utilizados para medir um determinado contaminante ambiental, onde as espécies vegetais selecionadas são expostas ao ambiente de avaliação. Os bioindicadores são importantes para caracterizarem a ecotoxicidade, uma vez que indica a presença de poluente, entretanto, não podem quantificar o nível de contaminação. Por outro lado, apresentam

baixo custo, facilidade de aplicação e são de fácil monitoramento, sendo uma ferramenta importante nos estudos de ecotoxicidade (MAKI *et al*, 2013).

A bioindicação é o uso de seres vivos para a verificação e avaliação da qualidade ambiental ou dos efeitos da poluição ambiental, seja do ar, da água ou do solo. Ainda, a princípio, cada ser vivo é um bioindicador, pois a resposta (a reação) a fatores externos (a ações) é um dos atributos fundamentais da vida em si, as respostas biológicas tendem a integrar os efeitos independentes e interativos de muitos estressores. Os estressores tendem a impactar a biota nos níveis mais baixos da organização biológica, alterações nos processos bioquímicos e fisiológicos de indivíduos; e posteriormente, impactar parâmetros em níveis mais elevados como a estrutura da comunidade (KLUMPP, 2001; KAPUSTA, 2008).

Segundo Grant (1994) os vegetais superiores, apresentam características excelentes de modelos genéticos para avaliação de poluentes ambientais, essas características não são só a sensibilidade de detecção de mutágenos em diferentes ambientes, mas, a possibilidade de utilização de diferentes células como biomarcadores genéticos, capaz desde mutações pontuais e até mesmo obter aberrações cromossômicas. Ainda segundo Alves (2001) as plantas superiores são organismos eucarióticos, complexos geneticamente e são facilmente cultiváveis e mantidas para serem utilizadas nos estudos de toxicidade genética por isso são muito úteis como bioindicadoras.

Neste contexto, a ecotoxicidade de materiais poliméricos se refere ao potencial toxicológico dos resíduos, chorume e gases voláteis produzidos durante sua biodegradação no ambiente. O principal objetivo da avaliação ecotoxicológica de polímeros compostáveis é garantir que não sejam liberadas substâncias nocivas ao meio ambiente, durante e depois da degradação (RUDNICK, 2008).

4. RESULTADOS

4.1. Teste de Fitotoxicidade

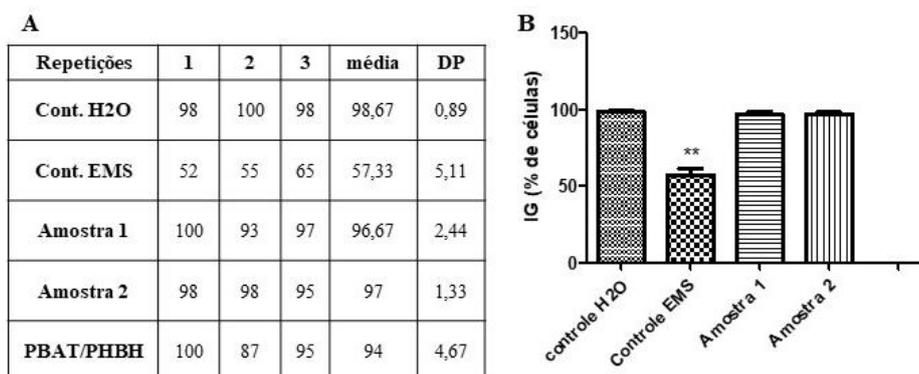
Análises de toxicidade são raramente exigidas pelos órgãos ambientais, o que parece ser um erro, já que testes como o de germinação com sementes são econômicos e fáceis de serem implementados pela maioria dos laboratórios credenciados pelos órgãos ambientais e trazem a resposta global que mais importa: o nível de toxidade da amostra analisada. Os ensaios fitotoxicológicos com germinação de sementes têm sido bastante utilizados atualmente como indicadores de poluição ambiental por causa da simplicidade

e economia proporcionada pelo método em comparação com outros tipos de análise e, apesar de não ser possível identificar diretamente qual composto está conferindo o caráter tóxico, esse teste consegue comparar níveis de toxicidade através do comprimento e porcentagem de germinação das sementes compondo um índice, o IG (índice de germinação, que é inversamente proporcional ao nível de toxicidade das amostras testadas (CHARLES *et al*, 2011; MENDES *et al*, 2020).

Plantas superiores reconhecidas como excelentes modelos para detectar mutágenos ambientais, sendo por isso frequentemente utilizadas em estudos de monitoramento. Dentre as espécies de plantas, a cebola (*Allium cepa*) tem sido usada para avaliar fitotoxicidade, danos ao DNA, como anormalidades cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico. O teste genotóxico que utiliza *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo programa Ambiental das Nações Unidas (GRIPPA *et al*, 2010). O teste do *A. cepa* é caracterizado como padrão ouro para a avaliação de anormalidades cromossômicas, índice mitótico, formação de micronúcleos e anormalidades nucleares na detecção de contaminantes, além de permitir a avaliação da ação de um agente e seus efeitos clastogênicos ou aneugênicos sobre o material genético (AUIB; FELZENSWALB, 2011; FERRETTI *et al*, 2007).

Os resultados do teste de fitotoxicidade dos concentrados obtidos das amostras Laminadas A1 e A2, na Figura 3. A análise estatística, comparando os grupos não mostrou diferenças significativas em relação ao controle negativo. Portanto, não houve efeito fitotóxico dos concentrados sobre as sementes de *Allium cepa*. A Figura 1 mostra a análise estatística da comparação entre os grupos.

Figura 1. A tabela abaixo mostra os resultados brutos obtidos de germinação das sementes expostas pelos controles indicados (A). Representação gráfica da comparação estatística da germinação das sementes expostas às amostras de concentrados (B). ** p<0,05



Fonte: Autora

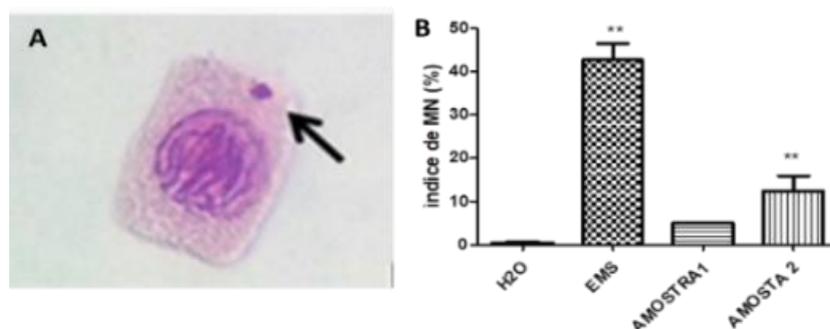
4.2. Teste de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade

Ensaio de toxicidade em cebolas são aconselhados por terem baixo custo, serem de fácil manuseio, e por terem DNA facilmente visualizado, são excelentes indicadores. Além disso o ensaio com cebola permite a avaliação de múltiplos parâmetros, como citotoxicidade com índice mitótico, genotoxicidade com anormalidades cromossômicas, e mutagenicidade com micronúcleos, de forma que permite a avaliação do mecanismo do poluente sobre o material genético (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Os micronúcleos são estruturas pequenas que são formadas a partir de aneugênese (perdas cromossômicas) ou por fragmentos cromossômicos (clastogênese), eles podem ser gerados pelas aberrações cromossômicas e devido às alterações na conformação da estrutura das fibras do fuso mitótico, também é possível os micronúcleos se originarem durante os eventos de poliploidização na tentativa da célula de restabelecer sua condição diploide (2N). Essas estruturas sugerem uma ação mutagênica pois decorre de alteração do material genético, que persiste através do ciclo de divisão, apesar de não comprometerem a viabilidade celular (FENECH, 2000; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; MARIN-MORALES, 2008).

Os resultados das análises após as preparações das lâminas mostraram que a Amostra 2 apresentou um índice de MN significativamente maior que o controle negativo e foi, portanto, a única amostra a apresentar efeito mutagênico. A representação gráfica da análise estatística de MN na Figura 2.

Figura 2. Em A observa-se uma célula com micronúcleo; Em B produção de MN nas células meristemáticas de raízes de *A. cepa* em representação gráfica



Fonte: Autora

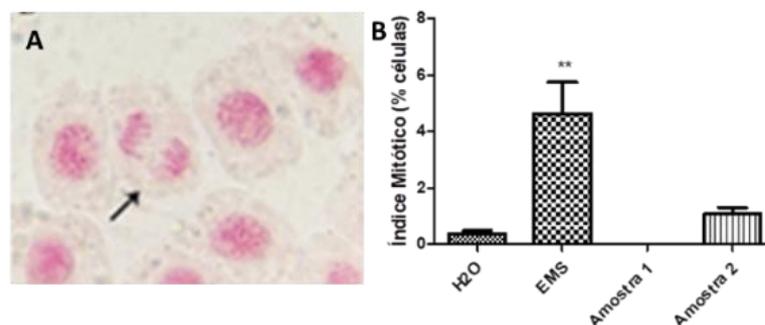
A citotoxicidade foi também avaliada pelo índice mitótico. O índice mitótico (IM) tem sido utilizado para avaliar a citotoxicidade de diversos agentes (LEME; MARIN-MORALES, 2009). O IM é um dado expresso em porcentagem que é utilizado para

avaliar a taxa de divisão celular. Ele tem se mostrado um parâmetro importante para se avaliar os efeitos que agentes químicos causam no ciclo celular (SMAKA-KINCL *et al.*, 1996; SOBRAL *et al.*, 2013). Alvin *et al.* (2011) relatam que qualquer mudança nas condições ambientais, principalmente por causa da poluição, pode ser observada nas plantas pela redução do crescimento radicular.

De acordo com Maschio (2009), o grau de citotoxicidade de um experimento pode ser estabelecido pelo aumento ou decréscimo do índice mitótico. O decréscimo do IM indica uma redução da divisão e celular e conseqüente redução no desenvolvimento da planta. Entretanto, também foi demonstrado que o aumento do índice mitótico está associado com poluentes de origem orgânica (DUSMAN *et al.*, 2012). Zortéa *et al.* (2015) relatam que situações em que o índice mitótico é maior quando comparado ao controle denotam a reprodução descontrolada das células, podendo haver uma má formação das células, comprometendo características de herdabilidade, o que proporciona implicações diretamente à saúde dos organismos expostos.

Os resultados de IM deste trabalho não mostraram diferenças entre as amostras A1 e A2 e o controle com água destilada (Figura 3).

Figura 3. Em A observa-se uma anáfase com perda cromossômica; em B Índice Mitótico (IM) das células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* exposta às amostras de laminações A1 e A2 em representação gráfica.



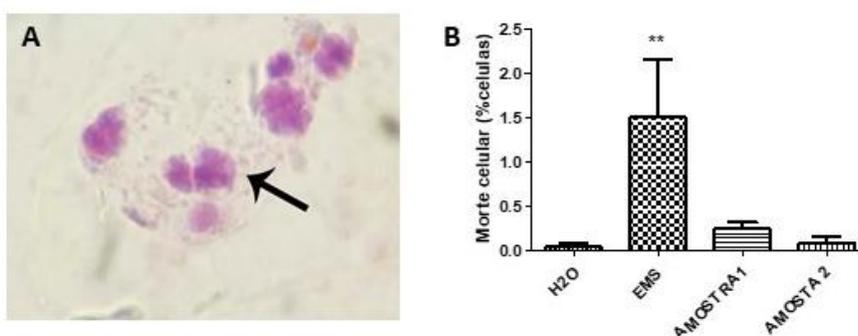
Fonte: Autora

Efeitos genotóxicos causados por determinados agentes promovem danos no DNA das células, como quebras cromossômicas e deleções de sequências de nucleotídeos, estes podem ocorrer quando as substâncias tóxicas entram com contato direto com o DNA nuclear ou de forma indireta onde o metabolismo celular é afetado o que acarreta uma divisão incorreta da célula. As alterações não são devidamente reparadas pelo sistema celular, essas células acumularão mutações que em um índice elevado, poderão perder o controle celular e desencadear processos carcinogênicos ou a de apoptose. A inibição das células em divisão não leva o organismo à morte normalmente,

mas, pode interferir no seu desenvolvimento devido a significativa quantidade de células em processo de morte, o que caracteriza um efeito citotóxico (MATSUMOTO *et al*, 2006).

E para avaliar os parâmetros morfológicos de morte celular, existem várias metodologias, e uma delas está relacionada às mudanças no potencial de membrana e à fisiologia celular devido às mudanças enzimáticas que ocorrem no processo de degeneração; e isso pode ser observável por mudanças morfológicas típicas como: citoplasma vacuolizado e fragmentação nuclear, núcleos deslocados e com aumento de tamanho, entre outros. (MARIN-MORALES, 2008). Os resultados das análises das lâminas das Amostras 1 e Amostra 2 para o parâmetro de morte celular não mostraram diferenças entre índices das amostras e o controle, indicando ausência de efeito citotóxico dos concentrados de solo obtidos após degradação das laminações. A representação gráfica e análise estatística pode ser observada na Figura 4.

Figura 4. Na imagem observa-se o resultado da análise estatística das contagens.



Fonte: Autora

5. CONCLUSÕES

Em conjunto, os dados apresentados permitem afirmar que os produtos de degradação das amostras laminadas A1 e A2 não apresentam efeito fitotóxico nas raízes de sementes de *Allium cepa* expostas aos concentrados de solo obtido após a desintegração dos biopolímeros.

A amostra 2 resultou em efeito mutagênico, muito provavelmente atribuído a blenda PBAT/PHBH, uma vez que em trabalho anterior (WITTMAN, 2020), esta amostra e a blenda isoladamente, apesar de não inibirem a germinação, provocaram efeito inibitório no crescimento das raízes e do hipocótilo em *Lactuca sativa* (alface). Este dado

aponta para um provável efeito da blenda de PBAT/PHBH, uma vez que sua presença na laminação é a única diferença entre as amostras A1 e A2.

A potencial de utilização de embalagens flexíveis fabricadas a partir desses biopolímeros podem ser apresentados como uma alternativa sustentável para a solução do problema de acúmulo de embalagens plásticas no ambiente, substituindo os persistentes polímeros sintéticos.

REFERÊNCIAS

- AIUB, C.A.F, FELZENSVALB I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar gentoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares. **Rev Genet Esc**; v.6, n. 1, p. 12-15. 2011.
- ALVES, E. S. *et al.* Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de Tradescantia; alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Rer. Bras. Bot**, V. 24, n. 4 (suplemento), São Paulo, dez. 2001.
- ALVIN, L. B. *et al.* Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Rev. Ambient. Água**, v. 6, n.2, p. 255-265, 2011.
- ASSIS, E. C. **Embalagens alimentícias produzidas em polihidroxido butirato (PHB), como alternativa ao gerenciamento dos resíduos sólidos urbanos**, 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Produção) – Faculdade de Tecnologia da Zona Leste, São Paulo, 2009.
- BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas de teste de Allium Cepa e células de mamíferos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- BRITO, G. F. *et al.* A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **REMAP**, v. 6., n. 2, p. 127-139, 2011.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromossome aberration in the *Allium cepa* test system caused by the expousure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722- 725, 2008.
- CHARLES, J. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 74, 2057–2064. 2011.
- COSTA, T. C. **Atividade mutagênica em bacia hidrográfica influenciada por sítio de contaminação de solos**. Dissertação de Mestrado, 2010. Curso de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- CRUZ, S.A. *et al.* Avaliação das propriedades reológicas de blendas de PEAD virgem/PEAD reciclado. **Polímeros**, São Carlos, v. 18, n. 2, p. 144-151, 2008.
- DUSMAN, E. *et al.* Cytotoxic potential of Waters of the streams Mandacaru, MaringáMiosótis and Nazareth in the urban area of Maringá, Paraná state, Brazil. **Acta Scientiarum**. v.34, n.3, p. 311-318. 2012.
- EBNESAJJAD, S. **Plastic films in food packaging: Materials, technology, and applications**. Elsevier. p. 398. 2013.
- FECHINI, G. J. M. **Polímeros Biodegradáveis: Tipos, Mecanismos, Normas e Mercado Mundial**. Editora Mackenzie, São Paulo, 2013.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam. V. 455, p. 81 – 95, 2000.

FERRETI, D.; ZERBRINI, C.; ZANI, E.; CERETTI, M.; MORETTI, M.; MONARCA, S. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. **Food Additives & Contaminants**, 24:6, 561-572. 2007.

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

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

FISKESJÖ, G; LEVAN, A. Evaluation of the first MelC chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, v. 21, p. 139 – 149. 1994.

FONSECA, C. C. **Produção e utilização do biopolímero poli(hidroxibutirato) (PHB) em embalagens alimentícias**. Trabalho de Conclusão de Curso, 2014. Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

FORTUNA, A.L.L. **Impactos ambientais dos plásticos: biopolímeros como alternativa para a redução do acúmulo de embalagens flexíveis de Polipropileno no meio ambiente**. Monografia em Engenharia Química, 2020. Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 273 - 291. 1982

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

GRIPPA, G. A. *et al.* Estudogenotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n.1-2, p. 11-16, 2010.

HAGMAR, L. *et al.* Impacto f types lymphocyte chromosomal aberrations on human câncer risk: result from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Research**. V. 64, 2258 – 2263. 2004.

HIPOLITO, I. S.; HIPOLITO, R. S.; LOPES, G. A. **Polímeros na Construção Civil**. In: Anais do X Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia – SEGeT, Resende - RJ, 2013.

KAPUSTA, S.C. **Bioindicação Ambiental**. Porto Alegre: Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. p. 36 c. 7.

KLUMPP, A., *et al.* Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). **Rev. Bras. Bot.** 24 (4): p. 511-518. 2001.

LANDIM, A. P. M.; BERNARDO, C. O.; MARTINS, I. B. A.; FRANCISCO, M. R.; SANTOS, M. B.; MELO, N. R. D. Sustentabilidade quanto às Embalagens de Alimentos no Brasil. **Polímeros**, vol. 26, p. 82-92, 2016.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**. Genetic Toxicity and Environmental Mutagenesis, v. 650, p. 80 – 86. 2008.

MACAGNAN, K. K.; SARTORI, M. R. K.; CASTRO, F. G. Sinais e sintomas da toxicidade do formaldeído em usuários de produtos alisantes capilares. **Cadernos da Escola de Saúde**. vol. 2, n. 4. 2010.

MAKI, E.S. *et al.* Utilização de Bioindicadores em Monitoramento de Poluição. **Biota Amazônia**. Macapá, v. 3, n. 2, p. 169-178, 2013

MARIN-MORALES, M. A. **A Utilização de *Allium cepa* como Organismo Teste na Detecção da Genotoxicidade Ambiental**. Rio Claro - SP: Instituto de Biociências - Unesp, p. 54. 2008.

MASCHIO, L. R. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto – SP**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. 2009.

MATSUMOTO, S.T. *et al.* Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tanner effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148 – 158, 2006.

MEDEIROS, K.M.; LIMA, C.A.P. **Novas tendências sustentáveis: os biopolímeros e os polímeros biodegradáveis**. p. 4. 2020.

MENDES, P.M. *et al.* Aprimoramento do ensaio fitotoxicológico com germinação de sementes de alface: confiabilidade e acurácia do método. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 4, p. 18178-18184. 2020.

OLESZCZUK, P.; HOLLERT, H. Comparison of sewage sludge toxicity to plants and invertebrates in three different soils. **Chemosphere**, vol. 83, n. 4, p. 502- 509, 2011.

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

RUDNIK, E. **Compostable Polymer Materials**. 1º Ed. Elsevier Ltd., 211p. 2008.

SMAKA-KINCL, V. *et al.* The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 368, n. 3–4, p. 171-179, 1996.

SOBRAL, O.; MARIN-MORALES, M. A.; RIBEIRO, R. Could contaminant induced mutations lead to a genetic diversity overstimulation? **Ecotoxicology**, v. 22, p. 838-846, 2013.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 626, p. 4 – 14. 2007.

VALENTE, D. *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Rev. Bras. Sa. Ocup.** vol. 42, n. 1, p. 1-21, 2017.

VENTURA, B.C. *et al.* Evidences of mutagenic and genotoxic action of the atrazine herbicide using *Oreochromis niloticus* as test system. **Pesticide Biomchemistry and Physiology**, v. 90, p. 42 – 51. 2008.

WITTMANN, G.C.P. **Estudo de Estruturas Laminadas com Bioplásticos para o Sistema Produtivo de Embalagens: Desintegração e Ecotoxicidade em Condições de Compostagem.** Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão e Tecnologia em Sistemas Produtivos). – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, 2020.

ZORTÉA, K. É. M. *et al.* Potencial citotóxico e genotóxico da água de rios do município de Carlinda, Mato Grosso, Brasil, por meio do teste *Allium cepa* L. **AgrarianAcademus, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.2, n.03, p.71-80, 2005.