

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KETELEN MICHELE GUILHERME DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE TRÊS FENÓIS AMBIENTAIS PELO TESTE DE
Allium cepa E DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE DIVULGAÇÃO
CIENTÍFICA

CURITIBA

2020

KETELLEN MICHELE GUILHERME DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE TRÊS FENÓIS AMBIENTAIS PELO TESTE DE
Allium cepa E DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE DIVULGAÇÃO
CIENTÍFICA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Daniela Morais Leme
Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Oliveira, Ketelen Michele Guilherme de
Avaliação ecotoxicológica de três fenóis ambientais pelo teste de *Allium cepa* e desenvolvimento de ferramentas de divulgação científica. / Ketelen Michele Guilherme de Oliveira. – Curitiba, 2020.
83 p.: il.

Orientadora: Daniela Morais Leme
Coorientadora: Marta Margarete Cestari

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Ecotoxicologia. 2. Fenóis. 3. Allium. 4. Toxicidade. 5. Dano ao DNA. 6. Divulgação científica. I. Título. II. Leme, Daniela Morais. III. Cestari, Marta Margarete, 1959. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 571.95



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KETELÉN MICHELE GUILHERME DE OLIVEIRA** intitulada: **AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE TRÊS FENOIS AMBIENTAIS PELO TESTE DE *Allium cepa* E DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA**, sob orientação da Profa. Dra. DANIELA MORAIS LEME, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

07/04/2020 10:14:09.0

DANIELA MORAIS LEME

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/04/2020 16:20:09.0

DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO)

Assinatura Eletrônica

01/05/2020 21:50:07.0

IZONETE CRISTINA GUILOSKI

Avaliador Externo (INSTITUTO PEQUENO PRÍNCIPE)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha família, por todo apoio, motivação e incentivo para eu perseguir meus sonhos e buscar torná-los uma realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por tudo mesmo!

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a. Dr.^a Daniela Morais Leme, por toda paciência, dedicação e carinho. Não posso descrever todo o aprendizado e ensinamentos que levarei para sempre em meu coração!

Agradeço aos meus pais Elaine e José, aos meus familiares, tia Delia e tio Marcos que me apoiaram de todas as formas, sem eles eu não teria conseguido chegar até aqui.

Importante citar meus queridos amigos Victoria de Almeida, Irisdoris de Souza, Isisdoris de Souza, Ronaldo dos Santos, William de Almeida e demais colegas que tornaram meus dias mais alegres e prazerosos, levarei todo o carinho e lições para a vida.

Agradeço a UFPR, ao departamento de Genética, a minha coorientadora, Prof.^a. Dr.^a Marta Margarete Cestari. A todos os professores da pós-graduação em Genética da UFPR, servidores da UFPR e a CAPES pelo financiamento dessa pesquisa. Muito obrigada por terem contribuído com a minha formação!

Sou muito agradecida a minha irmã Emily de Oliveira que me ajudou imensamente com todo o design do Jogo e aos meus queridos primos Alberto Guilherme e Kalebe Guilherme e amigo Johnny Souza, por toda a ajuda com o desenvolvimento do Jogo.

Agradeço a Tainá Wilke Sivek e Emanoela Lundgren Thá por terem me ajudado contando sementes, medindo raízes e preparando lâminas. A ajuda de vocês foi valiosa para mim!

RESUMO

Os contaminantes ambientais bisfenol A (BPA) e alquilfenóis (4-octilfenol: OP; 4-nonilfenol: NP) são substâncias de uso industrial e doméstico. Estes contaminantes chamam a atenção da comunidade científica principalmente por atuarem como alteradores endócrinos, porém, eles têm sido associados a efeitos adversos de vias não mediadas pelo sistema endócrino e que ainda requerem elucidações. Desta forma, o presente trabalho investigou o potencial destes contaminantes em causar toxicidade, danos celulares e alterações no material genético de sistemas vegetais (*Allium cepa*). Os contaminantes foram avaliados em suas formas como substâncias isoladas e em mistura, similares às concentrações encontradas no meio ambiente. Sementes de *A. cepa* expostas ao BPA, OP e NP nas formas isoladas e em mistura (MIX), foram avaliadas quanto à inibição da germinação e desenvolvimento das raízes (toxicidade) (BPA: 1,21; 2,42; 4,84; 9,68 e 19,36 ng/mL; OP: 0,725; 1,45; 2,9; 5,8 e 11,6 ng/mL; NP: 0,44; 0,88; 1,76; 3,52 e 7,04 ng/mL; MIX 1: BPA 4,84 + OP 2,9 + NP 1,76 ng/mL; MIX 2: BPA 9,6+ OP 5,8+ NP 3,52 ng/mL; MIX 3: BPA 19,36 + OP 11,6 + NP 7,04 ng/mL) e o potencial de causar alterações do ciclo celular (citotoxicidade) e no DNA (genotoxicidade/mutagenicidade) (BPA: 4,84; 9,68 e 19,36 ng/mL; OP: 2,9; 5,8 e 11,6 ng/mL; NP: 1,76; 3,52 e 7,04 ng/mL e MIX 1, 2 e 3). Estas substâncias, em suas formas isoladas e em misturas, não inibiram a germinação ou o desenvolvimento de raízes de *A. cepa* e, assim não apresentaram toxicidade para esse sistema-teste vegetal. Apesar das concentrações teste serem baixas e não apresentarem fitotoxicidade, as formas isoladas de BPA, OP e NP induziram efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células meristemáticas de *A. cepa*. Citotoxicidade e genotoxicidade ainda são efeitos encontrados quando estas substâncias são avaliadas em mistura, porém, os efeitos se mostram mais brandos em relação às respostas das substâncias isoladas. Tal fato indica que há uma interação entre estas substâncias químicas e que essa resulta em um efeito parcialmente inibitório frente aos efeitos induzidos pelas formas isoladas. De forma geral, nossos resultados mostram que BPA, OP e NP podem causar danos celulares e no DNA de plantas monocotiledôneas e que seus impactos no sistema vegetal podem ser reduzidos quanto em mistura, porém, não são completamente eliminados e, assim, atenção deve ser dada para a melhor estimativa dos riscos ecotoxicológicos desses alteradores endócrinos às plantas. Este trabalho também contou com uma segunda atividade, que tinha como objetivo promover a popularização da ciência. Assim, foram desenvolvidas ferramentas de divulgação científica para que os resultados da primeira etapa deste estudo pudessem ser transmitidos à sociedade, em geral, de forma educativa e divertida, conscientizando e enfatizando a importância do desenvolvimento das pesquisas nas universidades e contribuindo para a educação ambiental.

PALAVRAS-CHAVE: 4-nonilfenol; 4-octilfenol; bisfenol A; sistema-teste vegetal; toxicidade, danos no DNA; divulgação científica.

ABSTRACT

Environmental contaminants bisphenol A (BPA) and alkylphenols (4-octylphenol: OP; 4-nonylphenol: NP) are substances applied in industrial and domestic uses. These contaminants draw the attention of the scientific community mainly because they act as endocrine disruptors, however, they have been associated with adverse effects of pathways not mediated by the endocrine system which still require elucidation. Thus, the present work investigated the potential of these contaminants in causing toxicity and cellular and genetic material damages in plant systems (*Allium cepa*), both in their isolated and mixed forms, at concentrations similar to those found in the environment. *A. cepa* seeds exposed to BPA, OP and NP in isolated and mixed forms (MIX), were evaluated for germination inhibition and root development (toxicity) (BPA: 1.21; 2.42; 4.84 ; 9.68 and 19.36 ng/mL; OP: 0.725; 1.45; 2.9; 5.8 and 11.6 ng/mL; NP: 0.44; 0.88; 1.76; 3.52 and 7.04 ng/mL; MIX 1: BPA 4.84 + OP 2.9 + NP 1.76 ng/mL; MIX 2: BPA 9.6+ OP 5.8+ NP 3.52 ng/mL; MIX 3: BPA 19.36 + OP 11.6 + NP 7.04 ng/mL) and the potential to cause changes in the cell cycle (cytotoxicity) and in the DNA (genotoxicity / mutagenicity) (BPA: 4.84; 9.68 and 19.36 ng/mL; OP: 2.9; 5.8 and 11.6 ng/mL; NP: 1.76; 3.52 and 7.04 ng/mL and MIX 1, 2 and 3). These substances, in their isolated forms and in mixtures, were not able to inhibit the germination or the development of roots of *A. cepa* and, therefore, did not present toxicity for this vegetable test-system. Although the test concentrations are low and do not present phytotoxicity, the isolated forms of BPA, OF and NP induced cytotoxic and genotoxic effects in the meristematic cells of *A. cepa*. Cytotoxicity and genotoxicity effects were found when these substances are evaluated in mixture, however, the effects are milder in relation to the responses of the isolated substances. This fact indicates an interaction between these chemicals and these results in a partially inhibitory effect compared to the effects induced by the isolated forms. In general, our results show that BPA, OF and NP can cause cell and DNA damage to monocotyledonous plants. Their impacts on the plant system can be reduced when mixed, however, are not completely eliminated and, therefore, attention must be given to best estimate the ecotoxicological risks of these endocrine disruptors to plants. This work also featured a second activity, which aimed to promote the popularization of science. Scientific dissemination tools were developed so that the results of the first stage of this study could be transmitted to general society in an educational and fun way, raising awareness and emphasizing the importance of the development of research in universities and contributing to environmental education.

KEYWORDS: bisphenol A; 4-octylphenol; 4-nonylphenol; plants test system; toxicity, DNA damage; scientific divulgation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular dos contaminantes BPA, OP e NP.....	15
Figura 2. Degradação de alquifenóis no ambiente.....	17
Figura 3. Procedimento adotado para mensuração do comprimento de raízes de <i>A. cepa</i>	26
Figura 4. Site utilizado para criar os quadrinhos <i>Storyboard</i>	58
Figura 5. Capítulo I e II dos quadrinhos <i>Storyboard</i>	66
Figura 6. Menu do jogo.....	68
Figura 7. Representação das 10 fases do jogo.....	71
Figura 8. Aberrações cromossômicas nas diferentes fases do ciclo celular observadas nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i>	84

ARTIGO 01

Figura 1. Avaliação da toxicidade do Bisfenol A (BPA), Octilfenol (OP), Nonilfenol (NP) em suas formas isoladas utilizando o sistema-teste de <i>Allium cepa</i> e parâmetros de índice de germinação (IG) e desenvolvimento de raiz.....	38
Figura 2. Avaliação da toxicidade de misturas de Bisfenol A (BPA), Octilfenol (OP) e Nonilfenol (NP) utilizando o sistema-teste de <i>Allium cepa</i> e parâmetros de índice de germinação (IG) e desenvolvimento de raiz.....	39
Figura 3. Alterações citoplasmáticas indicativas de vacuolização do citoplasma após a exposição de células meristemáticas de <i>A. cepa</i> à BPA, OP e NP em suas formas isoladas e em misturas.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações dos contaminantes avaliadas pelos testes de toxicidade e citotoxicidade/genotoxicidade em <i>A. cepa</i>	24
---	----

ARTIGO 01

Tabela 1. Alterações em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas aos fenóis ambientais BPA, OP e NP avaliados isoladamente.....	40
Tabela 2. Alterações em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas aos fenóis ambientais BPA, OP e NP em mistura.....	41
Tabela 3. Tipos de alterações cromossômicas e anormalidades nucleares observadas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas aos fenóis ambientais BPA, OP e NP em suas formas isoladas.....	43
Tabela 4. Tipos de alterações cromossômicas e anormalidades nucleares observadas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas aos fenóis ambientais BPA, OP e NP em mistura.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

NP	-	4- Nonilfenol
OP	-	4- Octilfenol
AC	-	Aberraoes cromossômicas
DNA	-	cido desoxirribonucleico
APs	-	Alquilfenois
APnEO	-	Alquilfenóis polietoxilados
APEO	-	Alquilfenóis etoxilados
BPA	-	Bisfenol A
CN	-	Controle Negativo
CP	-	Controle Positivo
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
EPA	-	<i>Environmental Protection Agency</i>
EFSA	-	<i>European Food Safety Authority</i>
h	-	Horas
IG	-	ndice de germinaao
IM	-	ndice Mitótico
MMS	-	Metanossulfonato de metila
MN	-	Micronúcleo
min.	-	Minutos
MoA	-	Modo de aao
NPEO	-	Nonilfenol etoxilados
NPnEO	-	Nonilfenol polietoxilados
OPEO	-	Octilfenol etoxilado
OPnEO	-	Octilfenol polietoxilados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Bisfenol A, Octilfenol e Nonilfenol: caracterização química e suas aplicações.....	15
2.2. Impactos no meio ambiente causados por fenóis ambientais	16
2.3. Ação dos fenóis ambientais como alteradores endócrinos	18
2.4. Toxicidade dos fenóis ambientais em sistema vegetal	19
2.6. Uso de sistema vegetal <i>Allium cepa</i> para predizer impactos ambientais de contaminantes	20
2.6. Ferramentas para a divulgação científica.....	21
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Material.....	24
Os contaminantes testados neste trabalho foram:	24
4.2. Preparo das soluções	24
4.3. Bioensaio com <i>Allium cepa</i>	25
4.3.1. Teste de toxicidade.....	25
4.3.2. Teste de citotoxicidade e genotoxicidade em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> ...	26
4.6. Análise estatística	26
4.7. Ferramentas de divulgação científica.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CAPÍTULO I	30
CAPÍTULO II	56
5.2. Ferramentas de Divulgação científica	57
5.2.1. Quadrinho – <i>Storyboard</i>	57
5.2.2. Jogo científico	67
7. CONCLUSÃO	73
8. REFERENCIAS	74
ANEXO	84

1. INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos são um bem natural fundamental aos seres vivos e requerem qualidade físico-química e biológica para o seu uso seguro e conservação do meio ambiente (SPADOTO, 2013). Pensando nesse aspecto, existe uma crescente preocupação da comunidade científica e da população em geral quanto à exposição a substâncias químicas presentes no ambiente e seus possíveis efeitos para a saúde dos seres vivos (BAI, 2017).

Os contaminantes Bisfenol A (BPA) e alquifenóis 4-octilfenol (OP) e 4-nonilfenol (NP) são exemplos de substâncias fenólicas que atuam como alteradores endócrinos ambientais, devido às suas propriedades estrogênicas e impacto no sistema endócrino dos organismos (SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al., 2012; ZHOU et al., 2017). Diversos estudos relatam o potencial desses fenóis ambientais causarem efeitos tóxicos no desenvolvimento de animais (MCLEESE et al. 1981; JOBLING, et. al., 1996; HUNT et. al., 2003; SPADOTO, 2013).

Esses fenóis chegam ao meio ambiente por meio de efluentes doméstico e industrial (BENNETT; METCALFE, 1998; FÜRHACKER, et al., 2000). Dessa forma, para a melhor estimativa da periculosidade dessas substâncias, o cenário de misturas complexas também deve ser considerado. Visto que a interação entre substâncias químicas pode alterar o comportamento e sua toxicidade em relação às substâncias em suas formas isoladas (FELISBINO et al., 2018).

Existem poucos trabalhos que avaliaram a exposição dos fenóis BPA, OF e NP e efeitos de misturas a sistemas vegetais, especialmente quanto a parâmetros de genotoxicidade. As plantas possuem grande importância nos ecossistemas terrestres e aquáticos (base da cadeia alimentar – produtoras primárias), além de serem importantes indicadoras da qualidade ambiental pela interface de interação com o ar, o solo e a água (SOUZA, 2018). Dentre as plantas superiores, a espécie *Allium cepa* (cebola) tem sido relatada como um excelente sistema-teste para estudos de contaminantes ambientais com potencial de causar danos genéticos em sistemas vegetais (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES et al., 2009).

Desta forma, nosso estudo utilizou o sistema vegetal *A. cepa* para avaliar concentrações ambientais dos fenóis ambientais BPA, OF e NP em suas formas isoladas e em misturas, utilizando parâmetros de toxicidade (*i.e.*, germinação das sementes e

desenvolvimento de raízes) e de citotoxicidade/genotoxicidade (*i.e.*, Índice Mitótico e alterações cromossômicas e nucleares).

Considerando a relevância desse trabalho ecotoxicológico tanto para a comunidade científica como para a sociedade em geral, também foram desenvolvidas ferramentas que permitem a divulgação científica de forma acessível e lúdica para o público não técnico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Bisfenol A, Octilfenol e Nonilfenol: caracterização química e suas aplicações

Abaixo, na figura 1, está representada a estrutura molecular dos fenóis ambientais BPA, OP e NP. O BPA apresenta uma estrutura química de difenilalcano hidroxilado e possui dois anéis aromáticos unidos por ligação de carbono. Os alquilfenóis são formados por diferentes tipos e tamanhos de grupos alquila e são ligados a um anel aromático com ligação OH. Conforme menor o tamanho da cadeia alquílica, maior é o potencial de estrogenicidade do composto. No caso o OP que contém um fenol e uma cadeia com oito carbonos possui maior efeito estrogênico do que o NP que apresenta um fenol e nove carbonos em sua cadeia (BERALDO, 2012).

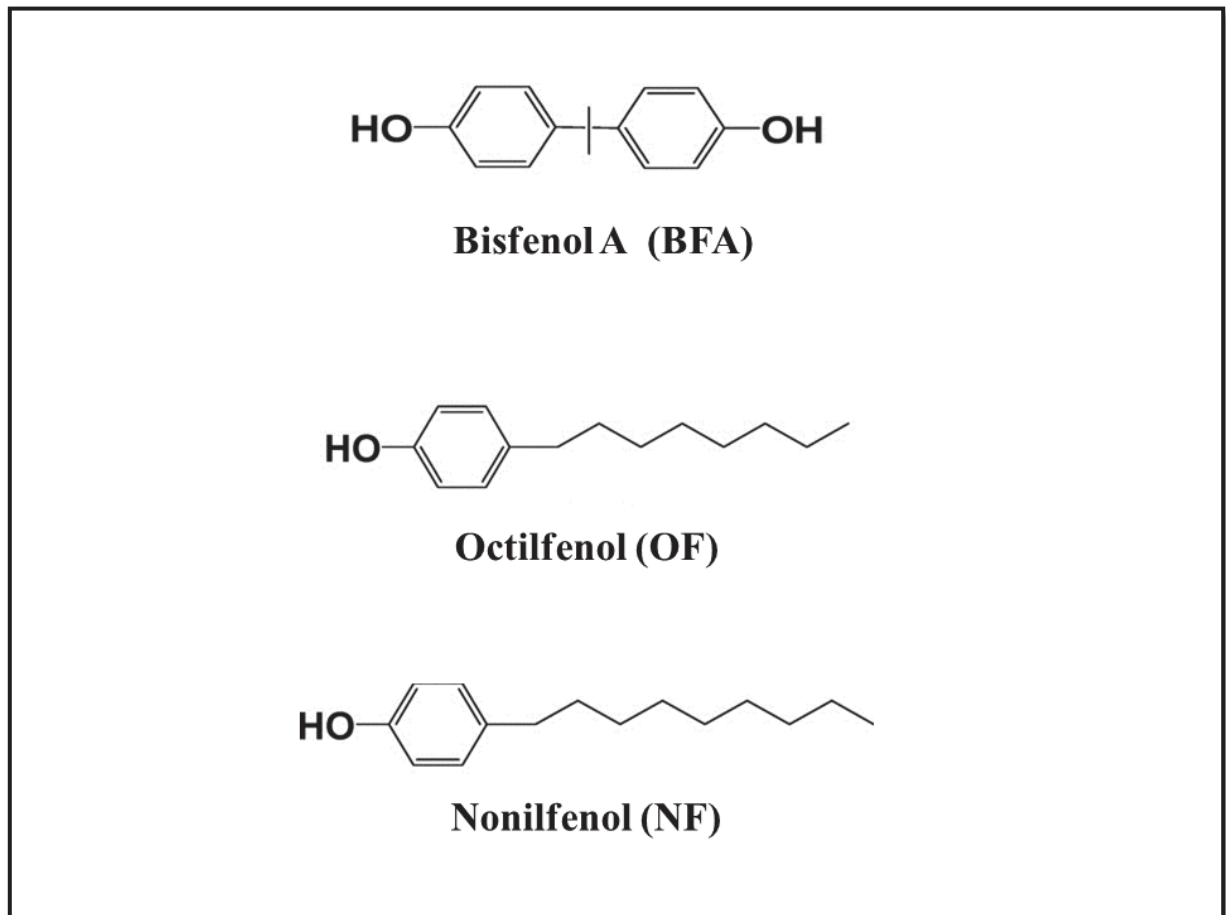


Figura 1. Estrutura molecular dos contaminantes BPA, OP e NP.

O BPA é utilizado em grandes quantidades para produção de policarbonatos (STEWART, A. J.; STEWART, R. F. 2008). Estima-se que em 2015 a demanda anual de BPA chegou a ser mais de 5 milhões de toneladas (ZHANG et al., 2019). Além de ser empregado na produção de plásticos policarbonatos, o BPA apresenta outras diversas aplicações domésticas e industriais (BENNETT; METCALFE, 1998). Ele é usado como estabilizador ou antioxidante na indústria química, selante dental e inclusive é utilizado na fabricação de embalagens de alimentos, podendo contaminar os mesmos (SONE et al., 2004). Em 2015, o BPA foi proibido para aplicações com materiais que teriam contato com alimentos na Europa (LEGEAY; FAURE, 2017). Em alguns países, inclusive no Brasil estão proibidos desde janeiro de 2012 a importação e fabricação de mamadeiras que contenham BPA (ANVISA, 2012). No entanto, as demais aplicações com BPA ainda é permitido no Brasil, mas a EFSA (*European Food Safety Authority*) estabelece o limite máximo de ingestão do BPA 0,05 mg/Kg de peso corporal/dia (EFSA, 2006).

Elevadas quantidades de alquilfenóis são produzidos anualmente (mais de 450.000 toneladas) para o uso industrial, agrícola e aplicações domésticas (CAO et al., 2017). Esses compostos são aplicados em indústria têxtil, em produção de plásticos, surfactantes não iônicos, antioxidante, herbicidas, cosméticos, entre outros (JIN et al., 2004; GRACA et al., 2016). Os surfactantes contendo alquilfenóis são utilizados em soluções aquosas, principalmente em produtos de higiene pessoal e limpeza domiciliar, sendo despejados diretamente no ambiente por meio de efluentes industriais e domésticos (BENNETT; METCALFE, 1998). Em alguns países como a União Europeia são proibidos o uso de NP e seus etoxilatos pela Diretiva No. 2003/53/EC (2003). No Reino Unido, Alemanha e Suíça foram proibidos surfactantes contendo alquilfenóis em produtos domésticos (CHEN et al., 2006). No Brasil, apenas no estado do Rio Grande do Sul são proibidos agrotóxicos contendo NP etoxilado (SUPREMO TRIBUNAL FEDERAL, 2018).

2.2. Comportamento dos fenóis no ambiente e rotas de degradação

Os contaminantes BPA e alquilfenóis OP e NP se encontram no meio ambiente em baixas concentrações, na ordem de microgramas ($\mu\text{g/L}$) (BENNETT; METCALFE, 1998; SHARMA et al., 2009) e nanogramas (ng/L) (CAO et al., 2019; LUO et al., 2019; TSUDA et al., 2000). O BPA possui baixa propensão acumulativa e resistência no meio ambiente, porém, os alquilfenóis NP e OP possuem moderada e elevada capacidade de persistência e acumulação, respectivamente (JARDIM, 2017).

Algumas substâncias potencialmente tóxicas presentes no ambiente aquático não são devidamente eliminadas nas estações de tratamento de esgoto. Os alquilfenóis etoxilados (figura 1) são exemplos de contaminantes ambientais que acabam sendo degradados em formas mais nocivas e resistentes (BERALDO, 2012).

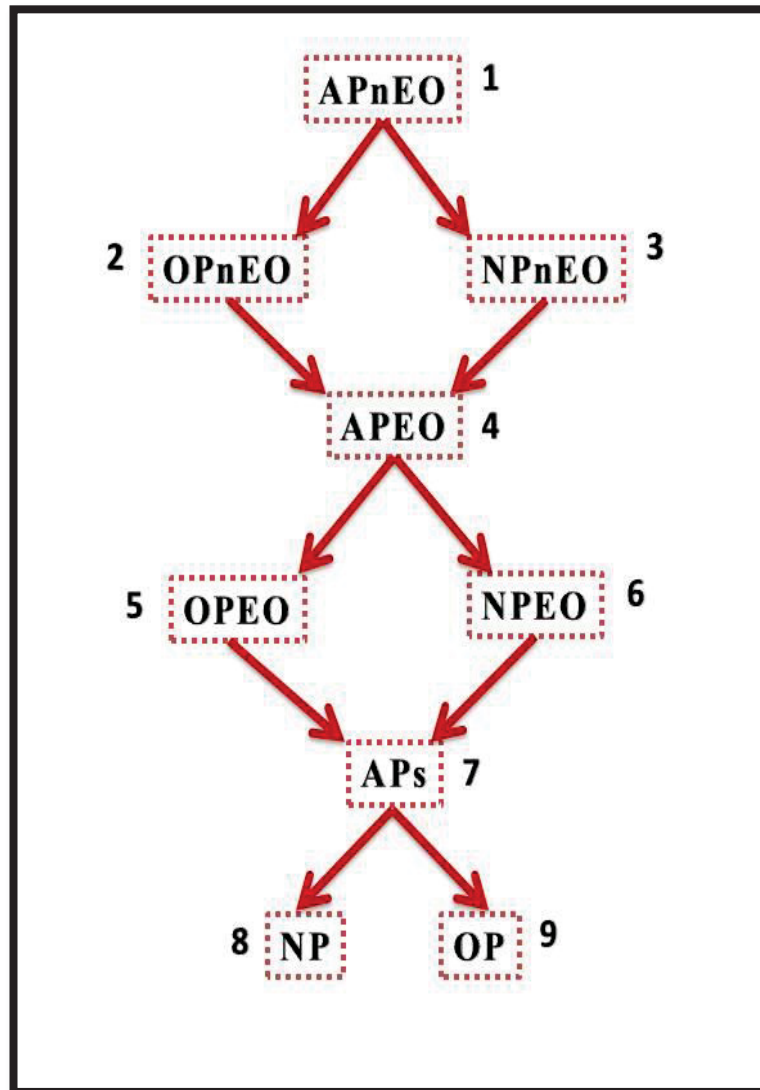


Figura 2. ¹ Alquilfenóis polietoxilados (APnEO), utilizados em produção de surfactantes na indústria, agricultura e aplicações domésticas. ² Octilfenol polietoxilados (OPnEO), constitui cerca de 20% dos APnEO. ³ Nonilfenol polietoxilados (NPnEO), constitui cerca de 80% a 85% dos APnEO. ⁴ No ambiente aquático, APnEO são aerobicamente degradados em formas menos complexas, alquilfenóis etoxilados (APEO). ⁵ Octilfenol etoxilado (OPEO). ⁶ Nonilfenol etoxilados (NPEO). ⁷ Durante o tratamento de esgoto, APEO são degradados em

alquilfenóis (APs), especialmente durante a digestão anaeróbica por atividade microbiana.⁸ Octilfenol (OP).⁹ Nonilfenol (NP).

Fonte: ISOBE et al., 2001; PRIAC, et al., 2017; EPA 2010.

Os alquilfenóis etoxilados são biodegradados em um processo que envolve perda gradual das cadeias etoxi, formando óxido de etileno, produtos carboxilados, octilfenol e nonilfenol (SILVA, 2013). Nas estações de tratamento de esgoto, os alquilfenóis polietoxilados (NPnEO e OPnEO), são convertidos em formas menos complexas: alquilfenóis etoxilados (NPEO e OPEO), e por último em alquilfenóis (NP e OP). Os APs são mais resistentes no ambiente e mais tóxicos, com efeitos estrogênicos a mamíferos e para os organismos aquáticos, enquanto que alquilfenóis polietoxilados possuem menor ação estrogênica nos organismos (ISOBE et al., 2001; PRIAC, et al., 2017).

O BPA é outro exemplo de contaminante usado em aplicações industriais e domésticas que tem como destino o esgoto doméstico e nas estações de tratamento de esgoto (FÜRHACKER, et al., 2000). Esses poluentes possuem como destino final os sistemas aquáticos e podem ser dissolvidos na água, em matéria orgânica ou adsorvidos em sedimentos, e dessa forma, são acumulados nesses sistemas (LEE et al, 2006; DING, et al., 2019).

2.3. Ação dos fenóis ambientais como alteradores endócrinos

Alguns produtos químicos industriais são conhecidos como alteradores endócrinos ambientais por serem capazes de se ligar ao receptor de estrogênio e imitar ou bloquear as atividades naturais do estrogênio no organismo biológico (NGUNDI et al., 2003). O BPA e alquilfenóis OP e NP, são produtos químicos industriais sintéticos que podem alterar o funcionamento fisiológico normal do sistema endócrino e estão na lista das substâncias capazes de gerar desregulação endócrina nos organismos vivos (BILA; DEZOTTI, 2007).

A exposição a essas substâncias pode desencadear diversos problemas, como alterações fisiológicas, no crescimento, no comportamento e na reprodução dos organismos (HEJMEJ et al., 2011; SPADOTO, 2013; BAI, 2017).

Alguns estudos relataram a toxicidade e o potencial de ação como alteradores endócrinos desses contaminantes em diversos organismos. A exposição de contaminantes alquilfenóis é potencialmente letal para os organismos aquáticos (*e.g.*, *Crangon*

septemspinosa e *Salmo salar*) (MCLEESE et al., 1981). NP e BPA foram relatados pela capacidade de induzir algumas anomalias no desenvolvimento de organismos planctônicos e bentônicos (SPADOTO, 2013) e de *Xenopus laevis* (SONE et al., 2004). Os alquilfenóis NP e OP causaram efeitos estrogênicos em peixes (e.g. *Oncorhynchus mykiss*) (JOBBLING, et. al., 1996). O BPA induziu distúrbios meióticos, incluindo aneuploidia em oócitos de camundongos fêmeas (HUNT et. al., 2003). Um estudo com anfíbios indicou que pode existir uma correlação consistente na exposição ao OP e mudança na expressão de genes relacionados com a síntese do hormônio esteróide nas gônadas de *Rana chensinensis* (BAI, 2017). Outro trabalho, com a mesma espécie *R. chensinensis*, demonstrou que o OP afetou vários processos fisiológicos, incluindo resposta imune, alteração na síntese do hormônio esteroide e influenciou a espermatogênese no testículo de *R. chensinensis* (LI et al., 2016).

2.4. Toxicidade dos fenóis ambientais em sistema vegetal

Raros estudos ecotoxicológicos foram realizados avaliando efeitos de BPA, OP e NP em sistema vegetal, para predizer os impactos destas três substâncias a plantas. Reporta-se toxicidade do NP (CHEN; YEN, 2013) e OF (CHEN; HSIAO; YEN, 2013) para a espécie *Arabidopsis thaliana* e do BPA para *Glycine max* (WANG et al., 2015). Quanto ao potencial de genotoxicidade, existem estudos que avaliaram a capacidade do BPA induzir anormalidades na estrutura e organização dos microtúbulos de *A. cepa* e *Triticum turgidum* (ADAMAKIS, et al., 2019) e aberrações cromossômicas em *A. cepa* (JADHAV et al., 2012). No entanto, esses estudos avaliaram concentrações elevadas que não são representativas de uma situação real no ambiente, as quais, em geral, são muito baixas. Além disso, no meio ambiente estas substâncias não estão presentes de forma isolada e suas interações podem modular a resposta ecotoxicológica, o que faz necessária a avaliação dos impactos de misturas nos sistemas biológicos.

2.5. Misturas complexas

A determinação do perigo/risco de substâncias químicas no ambiente aquático tem como foco central a avaliação de substâncias nas suas formas isoladas. No entanto, o meio ambiente é o destino final de diferentes substâncias e, assim, está sujeito a milhares de combinações de substâncias químicas de toxicidade variada. Dessa forma, os organismos estão expostos a misturas de contaminantes, no qual substâncias individuais podem produzir

respostas diferentes. As interações químicas de misturas estão sujeitas a efeitos tóxicos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (BARATA, et al., 2006).

A avaliação toxicológica de misturas pode esclarecer como misturas complexas se comportam no ambiente (SUN et al., 2009; GAN et al., 2015). Estudos demonstram diferentes efeitos ao comparar substâncias isoladas e misturas variáveis (OJO; PENG; NG, 2020; SHEN et al., 2020; SIGURNJAK, et al., 2020), demonstrando a importância de considerar a avaliação de substâncias combinadas para prever o perigo de exposição em estudos ecotoxicológicos.

2.6. Uso de sistema vegetal *Allium cepa* para prever impactos ambientais de contaminantes

A espécie *A. cepa* é um vegetal superior sensível para avaliar a toxicidade de poluentes ambientais (PAKRASHI et al. 2014). Dessa forma, o teste de *A. cepa* pode ser utilizado na avaliação de substâncias químicas puras e misturas complexas (e.g., amostras ambientais) e também para avaliar a qualidade da água e verificação do potencial de genotoxicidade de efluentes industriais e municipais (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Para a determinação da toxicidade de poluentes, o teste de *A. cepa* avalia o índice de germinação das sementes e a capacidade dos tratamentos provocarem a inibição do crescimento das raízes. As plantas são mais sensíveis a efeitos tóxicos durante o desenvolvimento e, por isso, critérios de avaliação como efeitos na germinação e desenvolvimento da raiz podem ser relevantes na avaliação de poluentes ambientais (DOGAN et al. 2010).

Quanto à avaliação da genotoxicidade de poluentes ambientais, é utilizada a porção meristemática do ápice radicular de *A. cepa*. O teste permite avaliar alterações no índice mitótico, aberrações cromossômicas e micronúcleo (SOUZA, 2018). O teste de *A. cepa* é validado pelo Programa Ambiental das Nações Unidas e pelo Programa Internacional de Segurança Química, para a avaliação de poluentes com potencial genotóxico (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999). Trata-se de um teste bem conhecido e apresenta bons fundamentos para ser conduzido em laboratório (FISKESJO, 1985). Apresenta baixo custo para conduzir o experimento, curto prazo para a obtenção de resultados, sensibilidade aos contaminantes ambientais e boa visualização dos cromossomos, devido à sua pequena quantidade e tamanho avantajado dos cromossomos ($2n=16$) (FISKESJO, 1985; LEME; MARIN-MORALES;

2008). Este sistema teste também apresenta grande correlação com sistemas teste em mamíferos (FERNANDES et al., 2009).

2.6. Ferramentas para a divulgação científica

Com exceção da comunidade científica, a concepção do papel do cientista na sociedade apresenta “imagens estereotipadas” (BULDU, 2006). Por isso, muitos pesquisadores têm buscado novas formas de comunicar a ciência à população em geral, produzindo conteúdos em mídias sociais, que podem tornar o conteúdo científico compreensível para diferentes públicos da sociedade (BIK; GOLDSTEIN, 2013). Nesse sentido, pode ser empregada a divulgação científica, a qual é definida como a utilização de uma gama variada de recursos para a disseminação de informações científicas ou tecnológicas ao público leigo (BUENO, 2009).

Na educação, por exemplo, podem ser utilizadas ferramentas para contribuir com o aprendizado, como a junção de criatividade, arte e ciência (KIND; KIND, 2008). O termo “*entertainment education*” ou “*edutainment*” é a junção de meios de entretenimento (*i.e.*, vídeos, TV, jogos, rádio, etc) e educação (WANG; SINGHAL, 2016). Existem exemplos *edutainment* com educação nutricional (JAYNE, 2019), saúde sexual e reprodutiva (WANG; SINGHAL, 2016) e jogos no computador para auxiliar no ensino de ciências (AN et al., 2016). Educação e entretenimento são excelentes estratégias para influenciar, conscientizar comportamentos e atitudes positivas em assuntos científicos e sociais (MOYER-GUSÉ, 2008), podendo também ser utilizada como ferramenta para a divulgação científica.

Ao longo dos anos diversas pesquisas de impacto nacional e internacional têm sido realizadas nas universidades brasileiras, principalmente nas vinculadas ao setor público. Os resultados de diferentes estudos são divulgados em linguagem científica por meio de publicação de artigos em revistas indexadas da área, que são redigidas em uma linguagem de compreensão limitada ao público não técnico. Assim, essa forma de divulgação não é efetiva para a divulgação e conscientização dos resultados de estudos científicos para pessoas que não apresentem domínio de conhecimento técnico (sociedade em geral). A ineficiência na divulgação de resultados científicos ao público não técnico tem levado a um distanciamento da sociedade e do setor acadêmico e de pesquisa. Assim, há uma iminente necessidade em desenvolver novas ferramentas de divulgação científica ou adequar metodologias educacionais já existentes para promover a divulgação científica. O desenvolvimento de ferramentas de popularização da ciência é, então, necessário para a maior acessibilidade

desses dados a diferentes públicos e que possam contribuir em aspectos como a preservação do meio ambiente e sustentabilidade (FIORESI; CUNHA, 2019).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de toxicidade e a capacidade de indução de danos celulares e no DNA de plantas expostas aos três fenóis ambientais (4-nonilfenol, 4-octilfenol e bisfenol A), em suas formas isoladas e em mistura e em concentrações similares às encontradas no meio ambiente. Além disso, este trabalho objetivou desenvolver ferramentas educacionais que permitam ampliar a divulgação dos resultados ao público não técnico.

Desta forma, os objetivos específicos foram:

- (1) Avaliar a toxicidade dos fenóis ambientais (isolados e em mistura) pelos parâmetros de índice de germinação de sementes e desenvolvimento de raiz de *A. cepa*;
- (2) Avaliar o potencial de indução de alterações no ciclo celular (citotoxicidade) e danos no DNA (genotoxicidade/mutagenicidade) dos contaminantes (isolados e em mistura) em células meristemáticas de *A. cepa*;
- (3) Comparar os efeitos dos contaminantes na forma isolada e em mistura;
- (4) Desenvolver ferramentas de divulgação científica por meio de um jogo científico e quadrinhos *Storyboard*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Os contaminantes testados neste trabalho foram:

- 4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol A) (CAS No. 80-05-7, Sigma-Aldrich);
- 4- nonylphenol (CAS No. 104-40-5, Sigma-Aldrich);
- 4- octylphenol (CAS No. 1806-26-04, Sigma-Aldrich).

Como organismo biológico utilizou-se sementes de *A. cepa* da variedade baia periforme, sem agrotóxicos, obtidas diretamente do fornecedor da marca Isla[®].

4.2. Preparo das soluções

As soluções teste dos contaminantes em estudo foram preparadas com Dimetilsulfóxido (DMSO) levando-se em consideração a concentração de solvente final de 0,1%-v/v para a exposição do sistema biológico (*A. cepa*).

A faixa de concentração testada foi determinada com base em dados ainda não publicados de nosso grupo, referente à análise química destes contaminantes em amostras de água do reservatório Iraí – reservatório responsável pelo abastecimento da região metropolitana de Curitiba, localizado nos municípios de Piraquara e Pinhais, Estado do Paraná.

Os testes de toxicidade foram realizados com cinco concentrações de cada contaminante, avaliados na forma isolada, e três concentrações para os testes das misturas destes contaminantes (Tabela 1). As análises de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizadas com as três maiores concentrações de cada contaminante devida à ausência de toxicidade e as três concentrações das misturas.

Tabela 1. Concentrações dos contaminantes avaliadas pelos testes de toxicidade e citotoxicidade/genotoxicidade em *A. cepa*.

Tratamentos	Concentrações
Bisfenol A	1,21; 2,42; 4,84; 9,68**; 19,36 ng/ml

Octilfenol	0,725; 1,45; 2,9; 5,8**; 11,6 ng/ml
Nonilfenol	0,44; 0,88; 1,76; 3,52**; 7,04 ng/ml
Mix 1	BF 4,84 + OP 2,9 + NP 1,76 ng/ml
Mix 2	BF 9,68** + OP 5,8** + NP 3,52** ng/ml
Mix 3	BF 19,36 + OP 11,6 + NP 7,04 ng/ml

**concentrações similares às encontradas no meio ambiente (Reservatório do rio Iraí, Paraná) (dados de nosso grupo não publicados). Mix: mistura.

4.3. Bioensaio com *Allium cepa*

Sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro (100 sementes/placa) e submetidas à germinação nas diferentes soluções teste dos contaminantes em estudo, em temperatura controlada (25°C) e na ausência de luz. As placas de Petri foram umedecidas a cada dois dias com a mesma quantidade de solução para evitar o ressecamento das placas em incubadora BOD. Decorrido este período de exposição, as raízes de *A. cepa* foram avaliadas quanto aos parâmetros de toxicidade e citotoxicidade/genotoxicidade.

Água ultrapura foi utilizada como controle negativo (CN) e DMSO a 0,1%-v/v em água ultrapura foi utilizado como controle solvente (CS). Sulfato de zinco heptahidratado a 6 mg/mL (CAS 7446-20-0, Sigma-Aldrich) como controle positivo (CP) do teste de toxicidade e metanossulfonato de metila (MMS, CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich) a 10 mg/L como CP do teste de citotoxicidade/genotoxicidade.

Os experimentos de toxicidade foram analisados em triplicata por tratamento e os experimentos para avaliação da citotoxicidade/genotoxicidade em uma única placa por tratamento.

4.3.1. Teste de toxicidade

Após cinco dias de exposição, o número de sementes germinadas (raízes > 0,5 cm) foi quantificado e o comprimento das raízes mensurado (Fig. 2). Com os dados determinou-se para todos os tratamentos realizados o índice de germinação (IG) e o comprimento médio (CM) das raízes (de LIMA et al., 2019; MATTOS et al., 2019; SANTOS-FILHO et al., 2019; SOUZA et al., 2020).

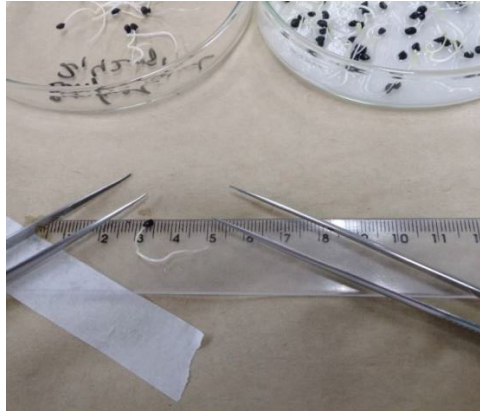


Figura 3. Procedimento adotado para mensuração do comprimento de raízes de *A. cepa*.

4.3.2. Teste de citotoxicidade e genotoxicidade em células meristemáticas de *A. cepa*

Após quatro dias exposição (raízes de ~ 2 cm de comprimento), as raízes foram fixadas em fixador Carnoy (3:1-álcool etílico P.A.: ácido acético glacial) e armazenadas a 4°C até a análise.

Para a coloração das raízes de *A. cepa*, as mesmas foram lavadas 3x com água destilada para a remoção do fixador, submetidas a hidrólise ácida (HCl 1N a 60°C por 8-10 min) e incubadas em Reativo de Schiff por 2 h. Em seguida, as lâminas citológicas foram preparadas com a região meristemática destas raízes, a qual foi disposta sobre uma lâmina e macerada suavemente em Carmim Acético 2%. Para torná-las permanentes, as lâminas foram mergulhadas em nitrogênio líquido para a remoção da lamínula de maceramento, secas *overnight* e montadas com resina Entellan (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Para a análise dos parâmetros de citotoxicidade/genotoxicidade, 5000 células por tratamento (500 células/lâmina em 10 lâminas/tratamento) foram analisadas. O número de células em divisão (Índice Mitótico – IM) foi quantificado para determinação da citotoxicidade. Diferentes tipos de aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN) foram quantificadas para determinação da genotoxicidade. Células micronucleadas foram contabilizadas para determinação da mutagenicidade. Além disso, os tipos de AC e AN foram agrupados em clastogênicas (quebras e pontes cromossômicas) e aneugênicas (broto nuclear, perda cromossômica, C-metáfase, aderência cromossômica, e atraso cromossômico) para determinar o modo de ação (MoA) genotóxicos dos contaminantes estudados.

4.4. Análise estatística

Os dados gerados pelos testes de toxicidade e citotoxicidade/genotoxicidade foram inicialmente avaliados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a determinação da toxicidade (IG e CM) da raiz dos tratamentos, citotoxicidade (IM), genotoxicidade (AC+NA) e mutagenicidade (MN), foram comparados com o CS pelo teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis, dependendo da distribuição do conjunto de dados e teste de comparação múltipla Dunnett ou Dunn's, respectivamente. Devido à utilização de DMSO nos tratamentos para diluição dos contaminantes e a ausência de diferença significativa entre os tratamentos com o CN e o CS, os testes estatísticos foram comparados apenas com o CS.

4.5. Ferramentas de divulgação científica

Para a popularização da ciência e educação do público não técnico quanto a conceitos de ecotoxicologia e sustentabilidade, foram desenvolvidas duas ferramentas digitais que serão brevemente explicadas abaixo.

A primeira ferramenta trata-se de quadrinhos educativos em forma de *Storyboards*, desenvolvidos pelo site *Storyboardthat*. Este site permite que educadores de diversas áreas utilizem essa ferramenta para tornar a aula mais divertida, além de possibilitar a publicação em meios digitais e redes sociais para uma divulgação mais ampla, que atinja a sociedade de forma geral. Utilizamos, assim, esta ferramenta, para elaborar material que pudesse demonstrar de forma simplificada os resultados deste estudo e seus principais achados para que os mesmos possam ser compreendidos por um público não técnico, no qual será destinado ao público jovem e adulto.

A segunda ferramenta refere-se ao desenvolvimento de um jogo digital para divulgação científica de produtos perigosos e sustentabilidade. O Jogo será destinado ao público jovem (14-18 anos) e aborda aspectos de educação ambiental e conhecimento científico sobre contaminantes ambientais e sustentabilidade compreendendo diferentes etapas do ciclo de vida de produtos (*e.g.*, produção, uso, descartes) que interferem em diferentes graus de impacto ambiental. Este jogo foi desenvolvido utilizando a plataforma Unity e o designer foi realizado pelo programa Sketchup e Canva. Como o desenvolvimento destas ferramentas requer conhecimentos de designer e programação, ela foi desenvolvida por uma equipe multidisciplinar, contando com a ajuda da Emily Jamiely Guilherme de Oliveira e Kalebe de Almeida Guilherme no design do jogo e do Alberto de Almeida Guilherme na programação do jogo.

O principal propósito desse estudo foi desenvolver essas ferramentas e disponibilizá-las nas redes sociais, o que não impede de no futuro avaliar se essas ferramentas de fato trouxeram efeitos positivos na conscientização do público quanto à divulgação científica dos aspectos desse trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados e a discussão dos mesmos foram elaborados em forma de capítulos. Desta forma, o primeiro capítulo refere-se à apresentação dos dados da avaliação dos fenóis ambientais pelo teste de *A. cepa*. Estes dados foram estruturados na forma de manuscrito, visando uma forma de publicação mais rápida após atender as sugestões de modificações dos membros da banca de dissertação. Pretende-se enviar este manuscrito a revista *Environmental Pollution*. O segundo capítulo refere-se à apresentação das ferramentas de divulgação científica desenvolvidas neste trabalho.

CAPÍTULO I

Avaliação da toxicidade e genotoxicidade de três alteradores endócrinos em suas formas isoladas e em mistura utilizando sistema teste vegetal (*Allium cepa*)

Ketelen Michele Guilherme de Oliveira^a, Tainá Wilke Sivek^a, Emanoela Lundgren Thá^a, Irisdoris Rodrigues de Souza^a, Ronaldo dos Santos Filho^a, Luciane Viater Tureck^a, Danielle Palma de Oliveira^b; Marta Margarete Cestari^a, Daniela Morais Leme^{a, c, *}

^a Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR) Curitiba, PR, Brasil.

^b Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

^c Instituto Nacional de Detecção de Tecnologias Alternativas, Avaliação e Remoção de Micropoluentes, Toxicológico e Radioativo (INCT-DATREM), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil.

*Autor de correspondência: Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética. Rua Cel. Francisco H. dos Santos, s/n. Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil.

E-mail: daniela.leme@ufpr.br, danielamoraisleme@gmail.com

Resumo

Alteradores endócrinos (EDs – *endocrine disruptors*), apesar de serem primariamente estudados quanto aos efeitos adversos em vias mediadas pelo sistema endócrino, têm sido associados a efeitos não específicos do sistema endócrino (*e.g.*, danos no DNA). Estes efeitos podem afetar processos fisiológicos de organismos não tradicionalmente inseridos em avaliações de EDs, como as plantas. Plantas são um relevante alvo de exposição a diversos EDs pela contaminação ambiental e uso de produtos agrícolas (*e.g.*, pesticidas) e, assim, requerem atenção especial para a determinação de potenciais efeitos adversos de EDs sobre este grupo de organismos. Neste trabalho nós avaliamos a toxicidade e a capacidade de

indução de danos celulares e no DNA de três fenóis ambientais (Bisfenol A – BPA, Octilfenol – OP, Nonilfenol – NP), reconhecidos como EDs, em concentrações ambientalmente relevantes (ng/mL), pelo teste de *Allium cepa* (planta, monocotiledônea). Estes fenóis também foram avaliados em mistura pelo fato de que interações entre substâncias podem alterar a toxicidade de suas formas isoladas e por ser mais representativo ao encontrado no meio ambiente. Os fenóis estudados não foram capazes de inibir a germinação das sementes e o desenvolvimento das raízes de *A. cepa* e, assim, não se mostraram tóxicos para esse sistema vegetal. No entanto, apesar da ausência de toxicidade, BPA, NP e OP foram capazes de induzir citotoxicidade (redução significativa do Índice Mitótico – IM) e genotoxicidade (aumento significativo da incidência de aberrações cromossômicas – AC) em células meristemáticas de *A. cepa* expostas as formas isoladas desses fenóis. Efeitos citotóxicos foram ainda observados nas misturas, porém, apenas na mistura composta pelas maiores concentrações testadas das formas isoladas, mostrando que a interação entre estes três fenóis altera o potencial citotóxico de suas formas isoladas. Quanto a genotoxicidade, apesar desse efeito ainda estar presente nas misturas, as frequências de AC das misturas se mostraram inferiores as observadas na avaliação das formas isoladas. De forma geral, nossos resultados mostram que BPA, OP e NP podem causar danos celulares e no DNA de plantas monocotiledôneas e que seus impactos no sistema vegetal podem ser reduzidos quando em mistura, porém, não são completamente eliminados e, assim, atenção deve ser dada para a melhor estimativa dos riscos ecotoxicológicos desses fenóis ambientais às plantas.

Palavras-chave: Bisfenol A, Octilfenol, Nonilfenol, germinação de sementes, desenvolvimento de raiz, danos no DNA.

1. Introdução

A identificação de agentes químicos com o potencial de atuar como alteradores endócrinos (EDs – *Endocrine Disruptors*) tem ganhado crescente atenção pela capacidade dessas substâncias afetarem o desenvolvimento e os sistemas reprodutivo e imunológico de organismos (Kim et al., 2019). Debate em andamento sobre a regulamentação de EDs tem levantado questões sobre endpoints endócrinos adequados para detectar efeitos tóxicos de produtos químicos EDs (Day et al., 2018). Neste contexto, mamíferos e peixes são os principais sistemas-teste biológicos utilizados na identificação de agentes químicos potencialmente EDs, pois a regulamentação visa, principalmente, prever efeitos adversos à saúde humana e à vida aquática (Browne et al., 2020). Contudo, EDs são utilizados em vários tipos de produtos industriais e, por isso, são constantemente descartados em ambientes terrestres, o que acarreta na exposição de organismos não tradicionalmente inseridos na

avaliação de EDs, como as plantas (Bruin et al., 2019; Kim et al., 2019). Além disso, apesar da bateria de testes para avaliação de EDs basear-se primariamente em *endpoints* de vias de desregulação hormonal, EDs têm sido associados a outros efeitos adversos como genotoxicidade, o que reforça, ainda mais, a necessidade de avaliar os efeitos de EDs em sistemas biológicos não tradicionais, como as plantas (Noorimotlagh et al., 2018).

Bisfenol A (BPA – *Bisphenol A*) é uma substância química sintética amplamente empregada na produção de plásticos policarbonatos e resina epóxi. A associação do BPA com alterações comportamentais, no sistema nervoso e na próstata de fetos, lactantes e crianças em casos de exposição humana, resultou em banimento de seu uso na fabricação de mamadeiras (Usman et al., 2019). Contudo, BPA apresenta outras diversas aplicações industriais e é uma das substâncias químicas com maior volume de produção, o que o faz constantemente presente em diversos compartimentos ambientais, apesar de seu tempo de vida curto (2,5 a 5 dias) (Babic et al., 2016). Nonilfenol (NP – *Nonylphenol*) e Octilfenol (OP – *Octylphenol*) pertencem ao grupo dos etoxilatos de alquilfenol, o qual se caracteriza como o maior grupo de surfactantes não iônicos, sendo empregados em produtos de limpeza (detergentes), cosméticos e pesticidas (Noorimotlagh et al., 2018; Bruin et al., 2019). Estas substâncias são liberadas ao ambiente terrestre, principalmente por meio da aplicação de pesticida, irrigação com água contaminada e acondicionamento de lodo de esgoto em solos (Singh et al., 2007). Dessa forma, assim como o BPA, apesar do NP e OP não se categorizarem como substâncias químicas persistentes, a constante liberação no meio ambiente confere risco a ambientes terrestres (Kim et al., 2019). Estudos já têm mostrado o potencial de desregulação endócrina do NP e OP (Kang et al., 2014; Duan et al., 2019; Xie et al., 2019), porém, as investigações dos efeitos adversos dessas substâncias estão direcionadas, principalmente à saúde humana e de organismos aquáticos (Bruin et al., 2019). Há uma escassez de dados ecotoxicológicos destes três contaminantes para plantas, mas os poucos existentes já apontam efeitos de

toxicidade no desenvolvimento e funções fisiológicas de sistemas vegetais (Chen et al., 2013; Adamakis, et al., 2019; Kim et al., 2019; Bahmani et al., 2020). Ressalta-se também que os estudos publicados até o momento são conduzidos de forma a avaliar essas substâncias isoladas e pouco se sabe quanto a seus efeitos em mistura, como são encontradas no meio ambiente (Sun et al., 2009). Interações de substâncias químicas podem levar a alteração de efeitos tóxicos (*i.e.*, aditivo, sinérgico, antagônico e efeitos potencializadores) de suas formas isoladas (Felisbino et al., 2018).

Ensaio de toxicidade com plantas são métodos de teste essenciais para a avaliação ecotoxicológica. Diferentes biomarcadores de toxicidade podem ser avaliados em sistemas teste de plantas para estimar efeitos tóxicos de contaminantes. *Allium cepa* é um dos mais importantes organismos modelo utilizados para estimar danos ao material genético induzidos por agentes químicos a vegetais superiores (de Lima et al., 2019). Danos genotóxicos na ecotoxicologia podem resultar em consequências de manifestação tardias na vida, e podem estar associados à redução da adaptabilidade de indivíduos e diversidade genética em populações e comunidades (Depledge, 1994; Jha, 2004).

Frente à importância das plantas para o ecossistema terrestre (*e.g.*, produtores primários) e visando a conservação de habitats naturais e progresso no sentido de alcance de metas de desenvolvimento sustentável, esse trabalho avaliou BPA, NP e OP, em suas formas isoladas e em misturas, em baixas concentrações (*i.e.*, concentrações ambientalmente relevantes), quanto ao potencial de fitotoxicidade e capacidade de indução de danos celulares e no material genético de plantas (sistema-teste *A. cepa*).

2. Material e Métodos

2.1. Substâncias químicas e faixa de concentração testada

Bisfenol A (CAS No. 80-05-7), 4-octilfenol (CAS No. 1806-26-04) e 4-nonilfenol (CAS No. 104-40-5), obtidos da empresa Sigma-Aldrich, foram as substâncias teste avaliadas neste estudo.

Para a avaliação das substâncias de forma isolada, foram utilizadas cinco concentrações no teste de toxicidade (*i.e.*, índice de germinação e desenvolvimento da raiz), como segue: BPA a 1,21, 2,42, 4,84, 9,68 e 19,36 ng/mL; OP a 0,725, 1,45, 2,9, 5,8 e 11,6 ng/mL e NP a 0,44, 0,88, 1,76, 3,52 e 7,04 ng/mL. As máximas concentrações foram definidas com base em concentrações detectadas no meio ambiente por estudos de nosso grupo (dados não publicados de análise química de contaminantes detectados no reservatório de água do rio Iraí, Curitiba, Paraná, Brazil). A partir dos resultados de toxicidade obtidos para as substâncias isoladas foram definidas três concentrações para a avaliação da toxicidade em mistura, como segue: BPA 4,84 + OP 2,9 + NP 1,76 ng/mL (MIX 1); BPA 9,68 + OP 5,8 + NP 3,52 ng/mL (MIX 2) e BPA 19,36 + OP 11,6 + NP 7,04 ng/mL (MIX 3).

Os resultados de toxicidade também direcionaram a escolha das concentrações para os testes de cito- e genotoxicidade, sendo as três maiores concentrações utilizadas para a avaliação das substâncias isoladas (BPA: 4,84, 9,68 e 19,36 ng/mL; OP: 2,9, 5,8 e 11,6 ng/mL; NP: 1,76, 3,52 e 7,04 ng/mL). As mesmas composições de misturas do teste de toxicidade foram empregadas para a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade (MIX 1, MIX 2, MIX 3).

2.2. Bioensaio com *Allium cepa*

Sementes de *A. cepa* (variedade baia periforme, Isla[®], Porto Alegre-RS/Brasil) foram dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro e umedecidas com as diferentes soluções teste (100 sementes/placa). As placas incubadas em BOD com controle de temperatura (25°C) e ausência de luz (Leme e Marin-Morales, 2008).

Todos os experimentos foram realizados acompanhados de controle negativo (CN, água ultrapura), controle solvente (CS, 0,1%-v/v Dimetilsulfóxido (DMSO)) e controle positivo (CP). Para o teste de toxicidade, sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4$) a 6 mg/mL (CAS 7446-20-0, Sigma-Aldrich) foi utilizado como CP e metanossulfonato de metila a 10 mg/L (MMS, CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich) foi utilizado como CP para a avaliação genotoxicológica.

Os experimentos de toxicidade foram realizados em triplicata por tratamento e os experimentos da avaliação genotoxicológica considerando uma única placa por tratamento.

2.3. *Teste de toxicidade*

Após cinco dias de exposição das sementes de *A. cepa*, o número de sementes germinadas (*i.e.*, raízes > 0,5 cm de comprimento) foi quantificado e o comprimento das raízes foi mensurado. Os dados obtidos foram analisados para a determinação do índice de germinação (IG) e o comprimento médio (CM) das raízes (de Lima et al., 2019; Mattos et al., 2019; Santos-Filho et al., 2019; Souza et al., 2020).

2.4. *Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade*

Raízes com cerca de ~ 2 cm de comprimento (quatro dias de exposição) foram coletadas, fixadas em fixador Carnoy (3:1-v/v/ álcool etílico P.A.: ácido acético glacial) e armazenadas a 4°C até a análise. Para confecção das lâminas citológicas e análise dos danos celulares e no DNA, as raízes de *A. cepa* foram submetidas à hidrólise ácida (HCl 1N a 60°C por 8-10 min) e incubadas com Reativo de Schiff (2 h) para coloração. As regiões meristemáticas foram posteriormente separadas, dispostas em lâminas e maceradas suavemente com Carmim Acético 2% e lamínula para obtenção de células isoladas. As lâminas foram submetidas ao nitrogênio líquido para remoção da lâmina e montadas com

resina sintética (Entellan) para confecção de lâminas permanentes (Leme; Marin-Morales, 2008).

Para a avaliação dos danos celulares e no DNA, foram analisadas 5000 células por tratamento (500 células/lâmina em 10 lâminas/tratamento). O número de células em divisão (Índice Mitótico – IM) foi quantificado para determinação da citotoxicidade. Diferentes tipos de aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN) foram quantificados para a determinação da genotoxicidade. As AC e AN foram também agrupadas em clastogênicas (quebras e pontes cromossômicas) e aneugênicas (broto nuclear, perda cromossômica, C-metáfase, aderência cromossômica, e atraso cromossômico) para determinar o modo de ação (MoA) genotóxico das substâncias estudadas. Células micronucleadas foram contabilizadas para determinação do potencial mutagênico.

2.5. Análise estatística

Os resultados de toxicidade (IG e CM da raiz) e de cito/genotoxicidade foram primeiramente verificados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e a determinação da toxicidade e cito/genotoxicidade se deu pela comparação dos grupos tratados com o CS pelo teste estatístico ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla (Dunnett ou Dunn's), dependendo da distribuição do conjunto de dados. Resultados significativos foram considerados para $p < 0,05$. Esta análise estatística foi utilizada tanto para a avaliação dos efeitos adversos das formas isoladas como das misturas.

3. Resultados

3.1. Avaliação da toxicidade

Todas as substâncias testadas (BPA, OP, NP) em suas formas isoladas não foram capazes de inibir a germinação e o desenvolvimento de raízes de *A. cepa* nas condições testadas (Fig. 1).

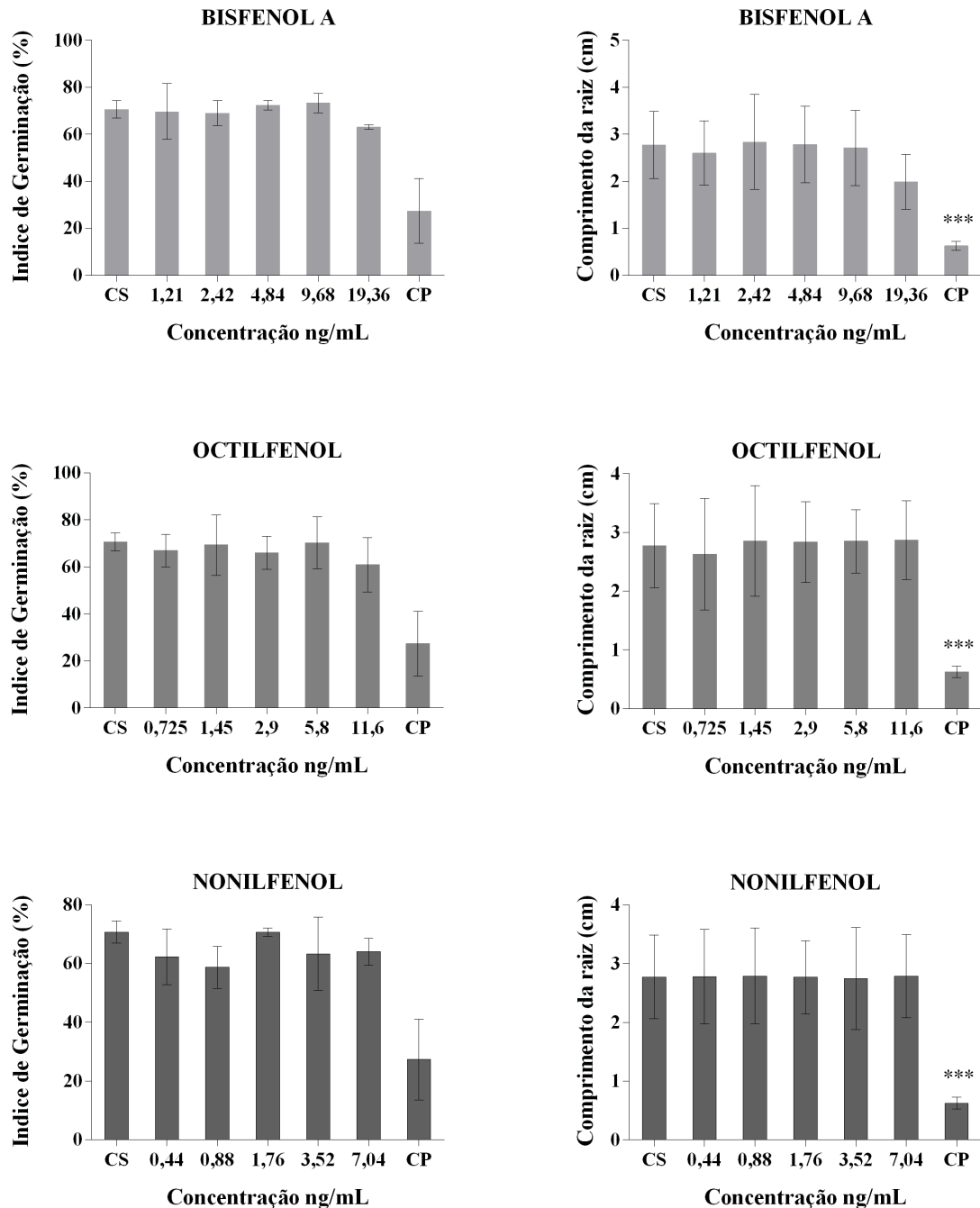


Figura 1. Avaliação da toxicidade do Bisfenol A (BPA), Octilfenol (OP), Nonilfenol (NP) em suas formas isoladas utilizando o sistema-teste de *Allium cepa* e parâmetros de índice de

germinação (IG) e desenvolvimento de raiz. *** $p < 0.0001$, diferenças significativas dos tratamentos com o CS pelo teste estatístico Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla Dunn's. CS: controle solvente (DMSO 0,1%-v/v); CP: controle positivo ($ZnSO_4$ a 6 mg/mL).

A avaliação das misturas de BPA+OP+NP também não evidenciaram toxicidade pela inibição da germinação ou desenvolvimento de raízes de *A. cepa*. No entanto, os comprimentos médios das raízes expostas as misturas MIX 1 e MIX 2 das substâncias teste se mostraram significativamente maiores que o CS (Fig. 2).

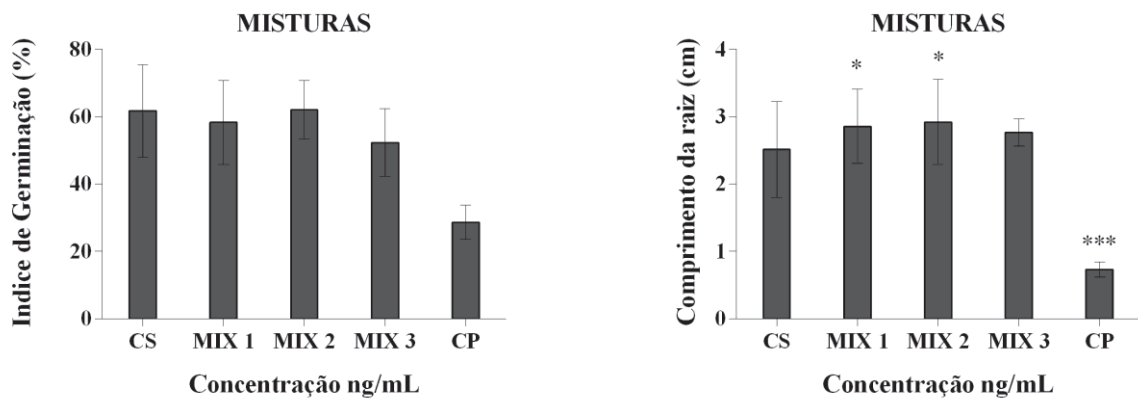


Figura 2. Avaliação da toxicidade de misturas de Bisfenol A (BPA), Octilfenol (OP) e Nonilfenol (NP) utilizando o sistema-teste de *Allium cepa* e parâmetros de índice de germinação (IG) e desenvolvimento de raiz. * $p < 0,05$; *** $p < 0.0001$, diferenças significativas dos tratamentos com o CS pelo teste estatístico Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla Dunn's. Mix 1: BPA 4,84 + OP 2,9 + NP 1,76 ng/mL; Mix 2: BPA 9,68 + OP 5,8 + NP 3,52 ng/mL; Mix 3: BPA 19,36 + OP 11,6 + NP 7,04 ng/mL; CS: controle solvente (DMSO 0,1%-v/v); CP: controle positivo ($ZnSO_4$ a 6 mg/mL).

3.2. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade mostrou que todas as substâncias teste em suas formas isoladas foram capazes de reduzir significativamente o IM de maneira concentração-dependente (Tabela 1).

Quanto à avaliação do potencial genotóxico, valores significativos de alterações genotóxicas (AC+AN) também foram verificados após a exposição a todas as substâncias testadas em suas formas isoladas (Tabela 1). Ao contrário da resposta citotóxica, o BPA mostrou efeito genotóxico de forma concentração-dependente invertida, na qual a menor concentração de 4,84 ng/mL produziu a frequência mais elevada de alterações genotóxicas. Os alquilfenóis OP 5,8 ng/mL e o NP 3,52 ng/mL apresentaram maior frequência de genotoxicidade nas concentrações intermediárias (Tabela 1).

Não houve alterações mutagênicas estatisticamente significantes na exposição de *A. cepa* aos fenóis ambientais BPA, OP e NP isolados nas concentrações testadas (Tabela 1).

Tabela 1. Alterações em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos fenóis ambientais BPA, OP e NP avaliados isoladamente.

	Substâncias Isoladas					
	Índice mitótico		Alterações genotóxicas		Alterações mutagênicas	
	%	M ± sd	%	M ± sd	%	M ± sd
CS	100	126 ± 27,22	100	1,15 ± 0,62	100	0,19 ± 0,60
BPA						
4,84	93	118 ± 18,83	675	7,76 ± 6,22*	421	0,80 ± 1,54
9,68	86	108 ± 22,03	543	6,25 ± 3,22*	742	1,41 ± 2,40
19,36	72	91 ± 26,09*	569	6,54 ± 3,68*	721	1,37 ± 2,73
OP						
2,9	86	108 ± 24,60	475	5,46 ± 3,55	1053	2,00 ± 2,93
5,8	72	90 ± 20,35*	758	8,72 ± 3,74**	1153	2,19 ± 2,29

11,6	67	85 ± 24,60*	624	7,18 ± 4,98*	853	1,62 ± 1,81
NP						
1,76	80	101 ± 22,47	761	8,75 ± 2,51***	805	1,53 ± 2,26
3,52	76	96 ± 22,43*	786	9,04 ± 3,79**	842	1,60 ± 1,90
7,04	73	92 ± 21,16*	600	6,90 ± 6,54	100	0,19 ± 0,39
CP						
213	268 ± 47,84***	1231	14,16 ± 5,15***	22016	41,83 ± 11,17***	

Dados expressos em Média ± Desvio padrão (M± sd) e porcentagem (%) em relação ao controle solvente. 5000 células analisadas por tratamento. *p <0,05; **p<0,001; ***p<0,0001, diferenças significativas dos tratamentos em relação ao CS pelo teste estatístico ANOVA ou Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla Dunnett ou Dunn's, dependendo da distribuição do conjunto de dados. IM: Índice Mitótico; AC: Aberrações Cromossômicas; AN: Anormalidades Nucleares; MN: Micronúcleos; CS: controle solvente (DMSO 0,1%-v/v); CP: controle positivo (MMS a 10 mg/L); BPA: Bisfenol A; OP: Octilfenol e NP: Nonilfenol.

Para a avaliação das substâncias em mistura, foi verificado que os valores de IM reduziram conforme o aumento da concentração, porém, apenas para a MIX 3 o resultado foi significativo (Tabela 02). Quanto às alterações genotóxicas, resultado significativo foi verificado apenas para a MIX 1 (Tabela 2). Assim como para as substâncias isoladas, valores significativos de células micronucleadas também não foram obtidos para a avaliação dessas substâncias em misturas (Tabela 2).

Tabela 2. Alterações em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos fenóis ambientais BPA, OP e NP em mistura.

Misturas		
Índice mitótico	Alterações genotóxicas	Alterações mutagênicas

	%	M ± sd	%	M ± sd	%	M ± sd
CS	100	87 ± 19,02	100	2,33 ± 1,13	100	0,20 ± 0,62
Misturas						
Mix 1	76	66 ± 20,33	390	8,44 ± 3,58*	215	0,43 ± 1,09
Mix 2	72	63 ± 12,57	295	5,27 ± 5,31	45	0,09 ± 0,27
Mix 3	64	56 ± 18,95*	298	5,07 ± 2,71	50	0,10 ± 0,31
CP	156	135,83 ± 80,45*	721	16,79 ± 4,19***	7905	15,81 ± 10,42***

Dados expressos em Média ± Desvio padrão (M ± sd) e porcentagem (%) em relação ao controle solvente. 5000 células analisadas por tratamento. *p <0,05; **p<0,001; ***p<0,0001, diferenças significativas dos tratamentos com o CS pelo teste estatístico ANOVA ou Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla Dunnett ou Dunn's, dependendo da distribuição do conjunto de dados. IM: Índice Mitótico; AC: Aberrações Cromossômicas; AN: Anormalidades Nucleares; MN: Micronúcleos; Mix 1: BPA 4,84 + OP 2,9 + NP 1,76 ng/mL; Mix 2: BPA 9,68 + OP 5,8 + NP 3,52 ng/mL; Mix 3: BPA 19,36 + OP 11,6 + NP 7,04 ng/mL; CS: controle solvente (DMSO 0,1%-v/v); CP: controle positivo (MMS a 10 mg/L); BPA: Bisfenol A; OP: Octilfenol e NP: Nonilfenol.

Para a determinação do modo de ação (MoA) genotóxico, a quantificação de diferentes tipos de AC e AN foi considerada e agrupada como alterações clastogênicas ou aneugênicas.

O total de alterações clastogênicas e aneugênicas dos contaminantes em suas formas isoladas, apontou que, apesar destes fenóis ambientais induzirem mais frequências significativas de pontes cromossômicas, eles exercem sua genotoxicidade principalmente pelo

MoA aneugênico (Tabela 3). As alterações mais abundantes nos diferentes tratamentos foram pontes cromossômicas, brotos nucleares e aderências cromossômicas.

Tabela 3. Tipos de alterações cromossômicas e anormalidades nucleares observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos fenóis ambientais BPA, OP e NP em suas formas isoladas.

		Substâncias Isoladas									
AC e AN		Concentrações (ng/mL)									
		BPA			OP			NP			
	CS	4,84	9,68	19,36	2,9	5,8	11,6	1,76	3,52	7,04	CP
Clastogênicas											
Quebras	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,66***
Pontes	0,13	0,5	0,46	0,6	0,4	0,69	0,72	0,77*	0,87*	0,64	0,86*
Total	0,13	0,5	0,46	0,6	0,4	0,69	0,72	0,77*	0,87*	0,64	1,52***
Aneugênicas											
Perdas	0	0	0	0	0,09	0	0	0,18*	0,07	0	0,20*
Aderências	0	0	0,12	0	0	0,15	0,09	0,38*	0,27*	0,17	0
C-Metáfases	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11
Broto	0,08	0,25	0,53	0,35	0,28	0,63*	0,37	0,22	0,67*	0,26	0,53
Atraso	0	0,2*	0	0	0	0,08	0	0,22	0	0	0,20*
Total	0,08	0,45	0,63*	0,35	0,37	0,86*	0,46	1*	1,01*	0,43	1,04***

Dados expressos em frequência (%). 5000 células analisadas por tratamento. *p <0,05; **p<0,001; ***p<0,0001, diferenças significativas dos tratamentos com o CS pelo teste estatístico Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla Dunn's. AC: aberrações cromossômicas; CS: controle solvente (DMSO a 0,1%-v/v); CP: controle positivo (MMS a 10 mg/L); BPA: bisfenol A; OP: octilfenol e NP: nonilfenol.

Para as misturas, as alterações mais abundantes nos diferentes tratamentos foram atrasos cromossômicos e pontes cromossômicas. Os valores totais de frequências de alterações clastogênicas foram menores que as alterações aneugênicas e, assim, reforça os dados que o MoA genotóxico destas substâncias é preferencialmente aneugênico.

Tabela 4. Tipos de alterações cromossômicas e anormalidades nucleares observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos fenóis ambientais BPA, OP e NP em mistura.

AC e AN	Misturas				CP
	CS	Concentrações (ng/mL)			
		Mix 1	Mix 2	Mix 3	
Clastogênicas					
Quebras	0	0	0	0	0,51***
Pontes	0,13	0,49	0,2	0,2	0,87***
Total	0,13	0,49	0,2	0,2	1,38***
Aneugênicas					
Perdas	0,08	0,28	0,29	0	0,20
Aderências	0,11	0,28	0,21	0,11	0,13
C-Metáfases	0	0,11*	0	0	0
Broto	0,09	0	0	0	0,85*
Atraso	0	0,4*	0,2	0,45*	0,44*
Total	0,28	1,07*	0,7	0,56	1,62***

Dados expressos em frequência (%). 5000 células analisadas por tratamento. *p <0,05; **p<0,001; ***p<0,0001, diferenças significativas dos tratamentos com o CS pelo teste estatístico ANOVA ou Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla Dunnett ou Dunn's, respectivamente. AC: aberrações cromossômicas; Mix 1: BPA 4,84 + OP 2,9 + NP 1,76 ng/mL; Mix 2: BPA 9,68 + OP 5,8 + NP 3,52 ng/mL; Mix 3: BPA 19,36 + OP 11,6 + NP 7,04 ng/mL; CS: controle solvente (DMSO a 0,1%-v/v); CP: controle positivo (MMS a 10 mg/L); BPA: Bisfenol A; OP: Octilfenol e NP: Nonilfenol.

Além das anormalidades acima mencionadas, as células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao BPA, OP e NP, tanto em suas formas isoladas como em mistura, apresentaram também alterações citoplasmáticas. Estas alterações citoplasmáticas foram evidenciadas por estruturas semelhantes a “bolhas” de tamanhos variados, indicando processo de vacuolização do citoplasma. Algumas células também mostraram ter tamanhos aumentados em relação ao padrão normal (Fig. 3).

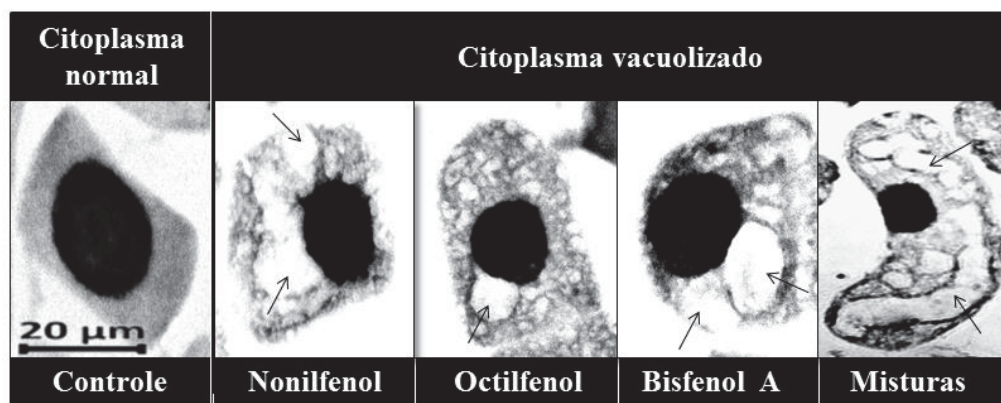


Figura 3. Alterações citoplasmáticas indicativas de vacuolização do citoplasma após a exposição de células meristemáticas de *A. cepa* à BPA, OP e NP em suas formas isoladas e em misturas. Foto retirada no Microscópio AxioLab A1 Zeiss no aumento de 40x.

4. Discussão

4.1. Avaliação da toxicidade

No presente estudo, não foram observados efeitos fitotóxicos (*i.e.*, inibição da germinação e do desenvolvimento de raízes) em *A. cepa* após exposição às formas isoladas de BPA, OP e NP. No entanto, outros estudos verificaram que estas substâncias são tóxicas para as plantas quando expostas a concentrações mais elevadas, em ordem superior a mg/L (Chen

et al., 2013; Chen e Yen, 2013; Wang et al., 2015). Isso é um diferencial de nosso trabalho, no qual estas substâncias foram avaliadas em baixas concentrações (ng/mL), como as encontradas no meio ambiente (Tsuda et al., 2000; Loos et al., 2008; Lee et al., 2013; Cao et al., 2019; Luo et al., 2019). Adicionalmente, os estudos que mostraram fitotoxicidade do BPA, OP e NP para sistemas vegetais foram conduzidos considerando um período de exposição dos agentes teste maior do que o empregado no presente estudo. Por exemplo, Chen et al (2013) mostraram a capacidade do OP de inibir severamente a germinação de sementes e reduzir o crescimento (biomassa e comprimento da raiz) de *Arabidopsis thaliana*, em concentrações de 1, 10 e 50 mg/L e após 10 dias de exposição. Chen e Yen (2013) demonstraram a redução de biomassa e inibição do desenvolvimento da raiz desta mesma espécie de planta (*A. thaliana*) após 10 dias de exposição a concentrações de 10 e 50 mg/L de NP. Wang et al (2015) verificaram que o BPA é capaz de reduzir o tamanho das folhas e raízes da soja após sete dias de exposição em concentrações de 48 e 96 mg/L. Dessa forma, não apenas a concentração testada, mas também o tempo de exposição, são fatores que influenciam na determinação da fitotoxicidade do BPA, NP e OP. Contudo, é importante salientar outro fator que pode estar associado à diferença de resposta fitotóxica dos estudos previamente publicados com o nosso trabalho e esse diz respeito a efeitos específicos entre grupos de plantas dicotiledôneas (e.g., *A. thaliana*, soja) e monocotiledôneas (e.g., *A. cepa*).

Os dois grupos de plantas (monocotiledôneas e dicotiledôneas) possuem diferenças na composição de proteínas e polissacarídeos da parede celular (Burke et al., 1974; Gigli-Bisceglia et al., 2019) e, quando expostos a contaminantes, podem apresentar diferenças quanto à permeabilidade, interação com agentes químicos e, por último, na tolerância a agentes estressores (Corrales et al., 2008; Piršellová et al., 2011). Para metais e herbicidas, diferenças na resposta tóxica entre plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas já são relatada na literatura (Huang, Cunningham, 1996; White, Boutin, 2007; Piršellová et al., 2011). Por

exemplo, Huang, Cunningham (1996) mostraram que plantas dicotiledôneas acumularam significativamente uma maior concentração de chumbo em suas raízes do que as plantas monocotiledôneas. Piršelová et al., (2011) demonstraram que o milho (monocotiledônea) apresentou maior sensibilidade a metais do que a soja (dicotiledônea), a qual apresentou respostas de defesa mais pronunciadas e, conseqüentemente, uma maior tolerância frente a esse estressor ambiental. Assim, no caso dos metais, plantas dicotiledôneas demonstraram maior capacidade de absorção dos contaminantes, porém, também apresentaram melhores sistemas de defesa, o que as conferiram maior tolerância em relação às plantas monocotiledôneas. Já para herbicidas, monocotiledôneas são, em geral, mais tolerantes que dicotiledôneas (White, Boutin, 2007, Schmitz, et al., 2015). Estas diferenças de respostas não estão claras para todos os tipos contaminantes e precisam ser investigadas devido à possibilidade de efeitos tóxicos classe-específico (*i.e.*, monocotiledôneas ou dicotiledôneas ou ambos). Dessa forma, avaliar os efeitos de contaminantes ambientais por diferentes sistemas-teste vegetais é importante, pois eles podem fornecer informações complementares para a determinação dos efeitos ecotoxicológicos.

Em relação à avaliação do BPA, NP e OP em mistura, outro cenário de resposta foi observado. A exposição de *A. cepa* às MIX 1 e MIX 2 apresentou efeito estimulatório no desenvolvimento das raízes. Exposição à EDs em mistura pode apresentar ação aditiva ou sinérgica, induzindo uma maior toxicidade do que a observada para os compostos isolados, devido à semelhança de seus modos de ação (MoA) e alvos. Efeitos de mistura podem ocorrer mesmo quando todos os componentes da mistura estão presentes em níveis que individualmente não produzem efeitos observáveis (Mao et al., 2019). BPA, OP e NP são similares quanto ao MoA e seus alvos em vias mediadas pelo sistema endócrino de organismos (Salgueiro-González et al., 2012; Miyagawa et al., 2016; Zhou et al., 2017) e, neste mesmo sentido, o efeito estimulatório observado pode ser devido à similaridade de alvos

e MoA no sistema vegetal, que promova um efeito aditivo que passa a ser observado como efeito biológico significativo. Não há dados na literatura da toxicidade de mistura composta pelos três EDs estudados (BPA, OP e NP), porém, um estudo ecotoxicológico da mistura de BPA e NP apontou efeito aditivo desses xenoestrógenos na inibição de defesas antioxidantes de embriões de peixe (Wu et al., 2011).

4.2. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

Apesar do BPA, OP e NP não induzirem fitotoxicidade, estes fenóis ambientais induziram danos celulares e no material genético de *A. cepa*, tanto em suas formas isoladas como em misturas. Alterações genéticas são uma categoria importante de efeitos adversos de contaminantes ambientais (Oliveira et al., 2018), pois danos genotóxicos, na ecotoxicologia, podem levar a consequências de manifestação tardias na vida dos organismos, podendo estar associadas à redução da aptidão física de indivíduos e à diversidade genética em populações e comunidades (Depledge, 1994; Jha, 2004, de Lima et al., 2019).

Citotoxicantes podem agir por meio do estresse oxidativo com a indução de alterações cromossômicas, que resulta no bloqueio do ciclo celular, permanecendo nas fases G1/G2 para o reparo de danos no DNA antes de retomar a mitose (Bianchi et al., 2016). A impossibilidade de reparo dos danos pode levar a morte celular, que inclui eventos de vacuolização do citoplasma e processo de degradação citoplasmática e do material nuclear. Todos os EDs estudados apresentaram a capacidade de inibir a divisão celular (*i.e.*, redução do IM) de forma concentração-dependente, quando avaliados nas suas formas isoladas. Associado a isso, foi verificado uma alteração celular, vacuolização do citoplasma, indicativa de morte celular.

A vacuolização do citoplasma é um processo que acontece naturalmente por meio da secreção e digestão celular ou em resposta a exposição a um xenobiótico (Henics, Wheatley, 1999). Assim, o aumento de vacúolos em células expostas a um toxicante pode indicar uma

ação de defesa da célula frente à internalização celular dessa substância. Vacuolização citoplasmática pode ser um processo reversível ou pode desencadear a morte celular em apenas uma única célula ou em uma população de células (Henics, Wheatley, 1999).

A avaliação conjunta dos dados de IM e alteração celular do tipo vacuolização do citoplasma indicam que BPA, OP e NP são citotóxicos para as plantas (monocotiledôneas). Este efeito ainda é observado quando estes EDs são avaliados em mistura, porém, ele permanece apenas na mistura composta pelas maiores concentrações dos contaminantes testados (MIX 3), apontando que a interação entre essas três substâncias modula de forma inibitória as respostas das formas isoladas.

Nossos resultados também mostraram que BPA, OP e NP são capazes de induzirem diferentes tipos de AC em células meristemáticas de *A. cepa*, podendo ser assim categorizados como genotóxicos para plantas (monocotiledôneas). Apesar da genotoxicidade destes EDs já estar descrita na literatura utilizando sistemas-teste vegetais, os estudos anteriores foram conduzidos com concentrações mais elevadas e que não são representativas de concentrações encontradas no meio ambiente (Adam, El-Ashry, 2010; Jadhav et al., 2012; Adamakis, et al., 2019). Desta forma, nosso estudo difere quanto ao fato de mostrar que a genotoxicidade destes EDs em suas formas isoladas permanecem mesmo em concentrações ambientalmente relevantes. Ressaltamos ainda que para alguns destes EDs, como BPA e NP, as frequências de alterações genotóxicas foram mais elevadas nas menores concentrações do que na maiores concentrações testadas. Tais resultados levantam a preocupação quanto às consequências negativas para plantas nativas frente à contaminação ambiental por estas substâncias.

Contudo, quando avaliados em mistura, genotoxicidade ainda foi observada, porém, apenas na mistura composta pela menor (MIX 1) concentração testada das formas isoladas. No entanto, ressalta-se que as frequências de alterações genotóxicas se mostraram cerca de 2x inferiores às observadas para os compostos isolados. Assim, como para a citotoxicidade,

interações de substâncias químicas podem alterar a resposta biológica da exposição das substâncias isoladas e, neste caso, verifica-se um efeito “inibitório” da ação genotóxica. Estudos adicionais são necessários para elucidar os tipos de interações químicas e no sistema biológico que estão resultando na modulação da resposta das substâncias isoladas.

Este estudo também verificou que BPA, OP e NP exercem sua atividade genotóxica tanto pelo MoA clastogênico como pelo MoA aneugênico, sendo este último o MoA genotóxico prioritário. Elevado nível de acetilação de microtúbulos corticais em células de *A. cepa* e *Triticum turgidum* expostas a BPA foi recentemente mostrado por Adamakis e co-autores (2019). Essa elevada acetilação dos microtúbulos acarreta na ruptura dessa estrutura celular o que, por sua vez, resulta na alteração do ciclo celular/citocinese. Outros estudos mostraram que o BPA também pode interferir no processo de montagem dos microtúbulos, resultando em alterações nos fusos mitóticos e, até mesmo, bloqueio do processo de divisão mitótica (Metzler, Pfeiffer, 1995; Ochi, 1999). O potencial do BPA de interferir na formação de microtúbulos e em sua estabilidade pode explicar o MoA genotóxico prioritariamente aneugênico, pois muitas das AC aneugênicas observadas são resultantes de disfuncionalidades no fuso mitótico (Vogt et al., 2008).

5. Conclusão

Considerando que as plantas podem ser expostas à EDs e a negligência em estimar os impactos ecotoxicológicos dessas substâncias para sistemas vegetais, nosso estudo foi pioneiro em avaliar os efeitos fitotóxicos e cito-/geno-tóxicos do BPA, OP e NP em concentrações ambientalmente relevantes e em suas formas isoladas e em mistura. BPA, OP e NP não apresentam ação fitotóxica, mas podem acarretar em impactos a plantas (monocotiledôneas) por induzirem citotoxicidade e alterações no material genético, como observado para *A. cepa*. A exposição em mistura apresenta uma menor capacidade de induzir

estes efeitos adversos, porém, ressalta-se que eles não são completamente eliminados. Estes dados ressaltam a necessidade de melhores avaliações de EDs em organismos alvos não prioritários nas avaliações tradicionais de substâncias com potencial de atuarem como EDs para melhor estimar os impactos ecotoxicológicos desta categoria de contaminantes ambientais.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP – Finance Code 001) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo concedidas a K.M.G.O., T.W.S., E.L.T., I.R.S., R.S.F. À Fundação Araucária pelo financiamento do Projeto Institucional “PBA na UFPR”- Convênio 006/2017.

Referências

- Adam, F.I.M., El-Ashry, Z.M., 2010. Evaluation of Genotoxicity of 4-n-Nonylphenol using *Vicia faba L.* *Journal of Biological Sciences*, 10, 368-372.
- Adamakis, I.D.S., Panteris, E., Eleftheriou, E.P., 2019. Tubulin Acetylation Mediates Bisphenol A Effects on the Microtubule Arrays of *Allium cepa* and *Triticum turgidum*. *Biomolecules*. 9, 185.
- Babic, S., Barisic, J., Bielen, A., Bosnjak, I., Klobucar, R.S., Ujevic, I., Strunjak-Perovic, I., Popovic, N.T., Coz-Rakovac, R., 2016. Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol A concentrations using the soil invertebrate *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 477–486.
- Bahmani, R., Kim, D.G., Modareszadeh, M., Thompson, A.J., Park, J.H., Yoo, H.H., Hwang, S., 2020. The mechanism of root growth inhibition by the endocrine disruptor bisphenol A (BPA). *Environmental Pollution*, 257, 113516.
- Bianchi, J., Fernandes, T.C., Marin-Morales, M.A., 2016. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. *Chemosphere*, 144, 475–483.
- Browne, P., Leon, Wal, L.V.D., Gourmelon, A., 2020. OECD approaches and considerations for regulatory evaluation of endocrine disruptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 504, 110675.
- Bruin, W., Kritzinger, Q., Bornman, R., Korsten, L., 2019. Occurrence, fate and toxic effects

of the industrial endocrine disrupter, nonylphenol, on plants - A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181, 419–427.

Burke, D., Kaufman, P., Mcneil, M., Albersheim, P., 1974. The Structure of Plant Cell Walls. *Plant Physiology*, 54, 109-115.

Cao, X., Wang, X., Chen, H., Li, H., Tariq, M., Wang, C., Zhou, Y., Liu, Y., 2019. Neurotoxicity of nonylphenol exposure on *Caenorhabditis elegans* induced by reactive oxidative species and disturbance synthesis of serotonin. *Environmental Pollution*, 244, 947-957.

Chen, B-S., Hsiao, Y-L., Yen, J-H., 2013. Effect of octylphenol on physiologic features during growth in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, 93, 2264-2268.

Chen, B-S., Yen, J-H., 2013. Effect of endocrine disruptor nonylphenol on physiologic features and proteome during growth in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, 91, 468-474.

Corrales, I., Poschenrieder, C.H., Barceló, J., 2008. Boron-induced amelioration of aluminium toxicity in a monocot and a dicot species. *Journal of Plant Physiology*, 165, 504–513.

Day, P., Green, R.M., Gross, M. Weltje, L. Wheeler, J.R., 2018. Endocrine Disruption: Current approaches for regulatory testing and assessment of plant protection products are fit for purpose. *Toxicology Letters*, 296, 10–22.

Depledge, M.H., 1994. Genotypic Toxicity : implications for individuals and populations. *Environmental Health Perspectives*, 101–104.

Duan, P., Liu, B., Morais, C.L.M., Zhao, J., Li, X., Tu, J., Yang, W., Chen, C., Long, M., Feng, X., Martin, L. F., Xiong, C., 2019. 4-Nonylphenol effects on rat testis and sertoli cells determined by spectrochemical techniques coupled with chemometric analysis, *Chemosphere*, 218, 64-75.

Felisbino, K., Santos-Filho, R., Piancini, L. D. S., Cestari, M. M., Leme, D. M., 2018. Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 150, 83-88.

Gigli-Bisceglia, N., Engelsdorf, T., Hamann, T., 2019. Plant cell wall integrity maintenance in model plants and crop species-relevant cell wall components and underlying guiding principles. *Cell. Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-019-03388-8

Henics, T., Wheatley, D.N., 1999. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: A view on new perspectives and features. *Biology of the Cell*, 91, 485-498.

Huang, J.W., Cunningham. S.D., 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist*, 134, 75-84.

Jadhav, V.V., Jadhav, A.S., Chandagade, C.A., Raut, P.D., 2012. Genotoxicity of Bisphenol

A on Root Meristem Cells of *Allium cepa*: A Cytogenetic Approach. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 9, 39–43.

Jha, A.N., 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms : an overview. *Mutation Research*, 552, 1-17.

Kang, Y., Yan, X., Li, L., Zhang, Q., Zeng, L., Luo, J., 2014. *Daphnia magna* may serve as a powerful tool in screening endocrine disruption chemicals (EDCs). *Environmental Science & Technology*, 48:881–882.

Kim, D.; Kwak, J. I.; An, Y-J., 2019. Physiological response of crop plants to the endocrine-disrupting chemical nonylphenol in the soil environment. *Environmental pollution*, 251, 573-580.

Lee, C-C., Jiang, L-Y., Kuo, Y-L. Hsieh, C-Y. Chen, C.S., Tien, C-J., 2013. The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems. *Chemosphere*, 91, 904-911.

Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. *Mutation Research*, 650, 80–86.

de Lima, G.G., Mendes, C., Marchi, G., Vicari, T., Cestari, M.M., Gomes, M.F., Ramsdorf, W.A., Magalhães, W.L.E., Hansel, F.A., Leme, D.M., 2019. The evaluation of the potential ecotoxicity of pyrolytic acid obtained from fast pyrolysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 616-623.

Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jimenez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leiendecker, F., Ternes, T., Ortega, A.N., Hildebrandt, A., Barcelo, D., Lepom, P., Dimitrova, I., Nitcheva, O., Polesello S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., Boer, R., Staeb, J., 2008. Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water. *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 89-95.

Luo, Z., Tu, Y., Li, H., Qiu, B., Liu, Y., Yang, Z., 2019. Endocrine-disrupting compounds in the Xiangjiang River of China: Spatio-temporal distribution, source apportionment, and risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 476-484.

Mao, W., Song, Y., Sui, H., Cao, P., Liu, Z., 2019. Analysis of individual and combined estrogenic effects of bisphenol, nonylphenol and diethylstilbestrol in immature rats with mathematical models. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 24, 32.

Mattos, B.D., Silva, L.R., Souza, I.R., Magalhães, W.L.E., Leme, D.M., 2019. Slow delivery of biocide from nanostructured, microscaled, particles reduces its phytotoxicity: a model investigation. *Journal of Hazardous Material*, 367, 513-519.

Metzler, M., Pfeffer, E., 1995. Effects of estrogens on microtubule polymerization in vitro: correlation with estrogenicity. *Environmental Health Perspectives*, 103, 21–22.

Miyagawa, S., Sato, T., Iguchi, T. Chapter 101 - Endocrine Disruptors. Handbook of Hormones Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research, p. 571-572, 2016.

Noorimotlagh, Z., Mirzaeec, S.A., Ahmadib, M., Jaafarzadehb, N., Rahimd, F., 2018. The possible DNA damage induced by environmental organic compounds: The case of Nonylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 171–181.

Ochi, T., 1999. Induction of multiple microtubule-organizing centers, multipolar spindles and multipolar division in cultured V79 cells exposed to diethylstilbestrol, estradiol-17beta and bisphenol A. *Mutation Research*, 431, 105–121.

Oliveira, G.A.R., Leme, D.M., de Lapuente, J., Brito, L.B., Porredón, C., Rodrigues, L.B., Brull, N., Serret, J.T., Borrás, M., Disner, G.R., Cestari, M.M., de Oliveira, D.P., 2018 A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. *Chemico-Biological Interactions*, 291, 171–179.

Piršelová, B., Kuna, R., Libantová, J., Moravčíková, J., Matušíková, I., 2011. Biochemical and physiological comparison of heavy metal-triggered defense responses in the monocot maize and dicot soybean roots. *Molecular Biology Reports*, 38, 3437-3446.

Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2012. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). *Journal of Chromatography A*, 1223, 1-8.

Santos-Filho, R., Vicari, T., Santos, S.A., Felisbino, K., Mattoso, N., Sant’Anna-Santos, B.F., Cestari, M.M.; Leme, D.M., 2019. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in *Allium cepa*. *Genetics and Molecular Biology*, 42, 425-435.

Schmitz, J., Stahlschmidt, P., Brühl, C. Protection of terrestrial non-target plant species in the regulation of environmental risks of pesticides. Karlsruhe, Germany: UBA-FB, 2015. (TEXTE 20/2015, Report (UBA-FB) No. 001962/E).

Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P., 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25, 99-121.

Souza, I.R., Silva, L.R., Fernandes, L.S.P., Salgado, L.D., Assis, H.C.S., Firak, D.S., Bach, L., Santos-Filho, R., Voigt, C.L., Barros, A.C., Peralta-Zamora, P., Mattoso, N., Franco, C.R.C., Medeiros, L.C., Marcon, B.H., Cestari, M.M., Sant’Anna-Santos, B.F., Leme, D.M., 2020. Visible-light reduced silver nanoparticles’ toxicity in *Allium cepa* test system. *Environmental Pollution*, 257, 113551.

Sun, L., Zha, J., Wang, Z., 2009. Interactions between estrogenic chemicals in binary mixtures investigated using vitellogenin induction and factorial analysis. *Chemosphere*, 75, 410–415.

Tsuda, T., Takino, A., Kojima, M., Harada, H., Muraki, K., Tsuji, M., 2000. 4-Nonylphenols

and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. *Chemosphere*, 41, 757-762.

Usman, A., Ikhlas, S., Ahmad, M., 2019. Occurrence, toxicity and endocrine disrupting potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A mini-review. *Toxicology Letters*, 312, 222–227.

Vogt, E., Kirsch-Volders, M., Parry, J., Eichenlaub-Ritter, U., 2008. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 651, 14–29.

Wang, S., Wang, L., Hua, W., Zhou, M., Wang, Q., Zhou, Q., Huang, X., 2015. Effects of bisphenol A, an environmental endocrine disruptor, on the endogenous hormones of plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 17653–17662.

White, A.L., Boutin, C., 2007. Herbicidal effects on nontarget vegetation: Investigating the limitations of current pesticide registration guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 2634-2643.

Wu, M., Xu, H., Shen, Y., Qiu, W., Yang, M., 2011. Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 2335-2341.

Xie, L., Li, X-Y., Liang, K., Wu, C., Wang, H-Y., Zhang, Y-H., 2019. Octylphenol influence growth and development of *Rana chensinensis* tadpoles via disrupting thyroid function, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 747-755.

Zhou, Q., Lei, M., Li, J., Zhao, K., Liu, Y., 2017. Sensitive determination of bisphenol A, 4-nonylphenol and 4-octylphenol by magnetic solid phase extraction with Fe@MgAl-LDH magnetic nanoparticles from environmental water samples. *Separation and Purification Technology*, 182, 78-86.

CAPÍTULO II

5.2. Ferramentas de Divulgação científica

Duas ferramentas de divulgação científica foram elaboradas neste estudo e os produtos serão apresentados a seguir. Ressalta-se que neste trabalho focamos no desenvolvimento da ferramenta e em um projeto futuro (Doutorado) será avaliada a aplicabilidade dessas ferramentas para promover a divulgação científica (*i.e.*, aplicação no público alvo e avaliação por meio de questionários de diagnósticos).

5.2.1. Quadrinho – *Storyboard*

Os quadrinhos desenvolvidos têm como público alvo, principalmente, jovens usuários de redes sociais. Pretende-se assim publicar os quadrinhos elaborados na rede social (Instagram) do Laboratório de (Eco)Toxicologia *In Vitro*, do Departamento de Genética, da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (@lab.ecotox_ufpr).

Esta ferramenta pode se enquadrar na categoria de jornalismo científico. O jornalismo científico pode ter um caráter informativo por meio de notas e notícias ou um caráter opinativo como em editoriais, artigos, crônicas e cartoons (ALBAGLI, 1996).

Estudos recentes foram desenvolvidos com o propósito de divulgar diferentes assuntos em forma de histórias em quadrinhos. Podem ter um caráter de aprendizado ou informativo, voltado a disseminar temas difíceis ou de importância social.

Kilanowski (2020) desenvolveu uma história em quadrinhos educacional bilíngue em forma de gibis de segurança para vários sites de agricultura, migrantes, agências, universidades e extensões para informar as famílias sobre questões de segurança e orientações para o trabalho agrícola.

Em estudo feito por Chung et al. (2020) avaliaram 246 estudantes de medicina coreanos quanto a memorização de estruturas anatômicas complicadas após a inclusão de quadrinhos em um livro de anatomia. O estudo relatou que houve um aumento significativo das notas em anatomia dos alunos que participaram da pesquisa.

Lee et al. (2019) desenvolveram divulgação de quadrinhos abordando vários temas de câncer de mama, desde diagnóstico e cirurgia. O quadrinho animado funciona como um recurso de informação e visa o entendimento dos pacientes sobre os impactos das emoções que surgem quando sofrem de câncer de mama.

Inclusive existem estudos que objetivaram conscientizar sobre cuidados e melhorias da saúde, como Brüggemann et al. (2019) que utilizou histórias em quadrinhos para conscientizar e induzir a reflexão de pacientes em situações de abuso com a saúde. Outro trabalho feito por Shimazaki et al. (2018) demonstrou que as intervenções no mangá (quadrinhos no estilo Japonês) têm potencial para incentivar uma alimentação saudável em pacientes com síndrome metabólica.

Ao longo dos anos as histórias em quadrinhos tem demonstrado grande aceitação principalmente entre jovens e crianças. Pensando no público jovem e adulto foi desenvolvido quadrinhos para divulgação deste trabalho. Abaixo está representada a plataforma utilizada para desenvolver os quadrinhos *Storyboard* com o propósito de divulgar a sociedade nossos resultados da avaliação ecogenotoxicológica do BPA, NP e OF (Fig. 13).



Figura 4. Site utilizado para criar os quadrinhos *Storyboard*.

Fonte: <https://www.storyboardthat.com/>.

A seguir os quadrinhos *Storyboard* estão detalhados. As histórias foram divididas em dois capítulos, o primeiro relata a origem e problemática dos contaminantes BPA, OF e NP e no segundo capítulo foi utilizado para representar os testes e os resultados deste trabalho.









BISFENOL A





NONILFENOL



OCTILFENOL

CAPÍTULO I: CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL - FENÓIS!

• <https://pixabay.com/illustrations/monster-black-and-white-eyes-426996/> •
geralt • Free for Commercial Use / No Attribution Required
(<https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0>)

E o que são parâmetros de toxicidade?

São os efeitos observados em um sistema biológico, por exemplo mortalidade, danos no material genético (DNA), etc...

BISFENOL A -
UTILIZADO NA PRODUÇÃO DE POLICARBONATOS, PARA FABRICAÇÃO DE PLÁSTICOS, EMBALAGENS DE ALIMENTOS E UTENSÍLIOS.

OCTILFENOL E NONILFENOL
- SÃO UTILIZADOS NA FABRICAÇÃO DE DETERGENTES, DESINFETANTES, AGROTÓXICOS, ENTRE OUTRAS APLICAÇÕES...

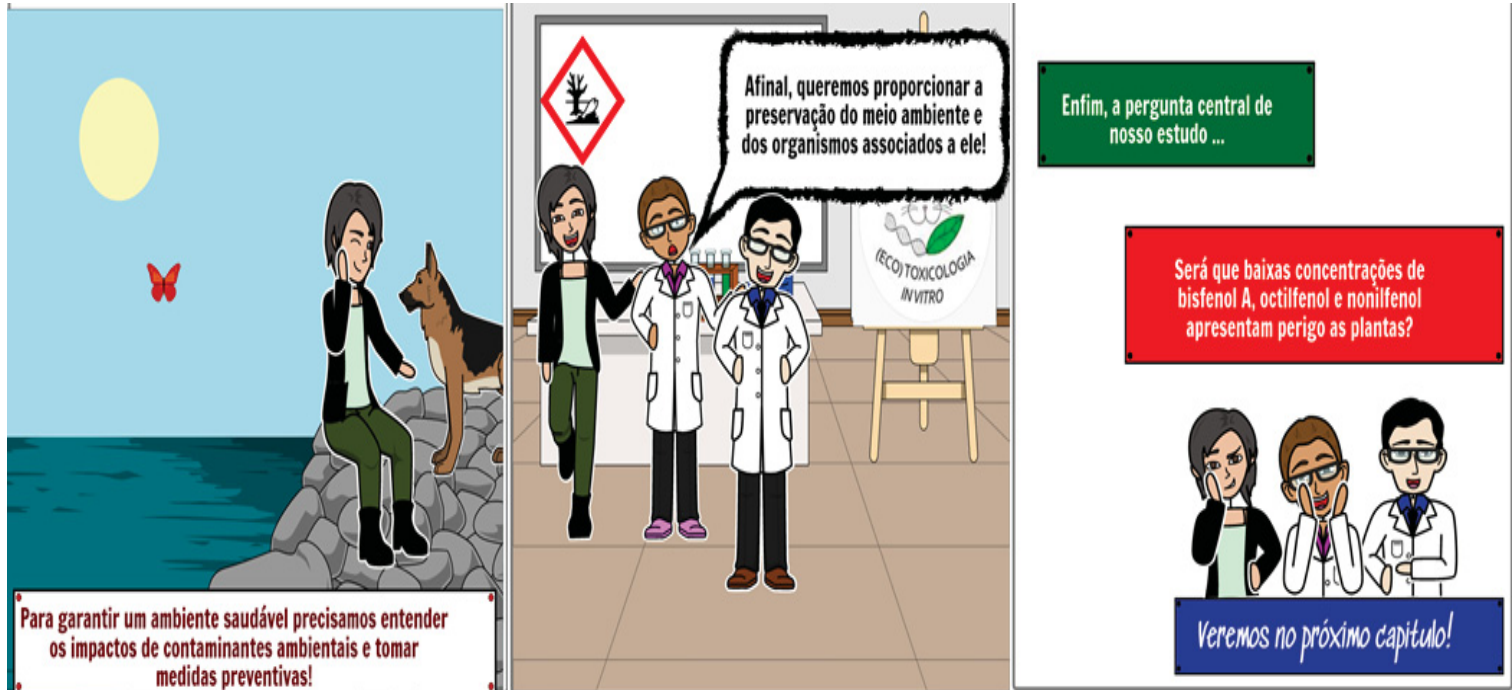
E estas substâncias, por que elas estão tão presentes no meio ambiente?

Ao limpar nossa casa, por exemplo, utilizamos vários produtos de limpeza que contém nonilfenol e octilfenol ou até bisfenol A!

Da sua casa, estas substâncias vão parar no esgoto, que são direcionados às estações de tratamento de esgoto. Elas não são devidamente removidas pelos tratamento de esgoto e acabam sendo descartados no meio ambiente.

Assim, estas substâncias estão sendo constantemente liberadas ao meio ambiente!

Para garantir um ambiente saudável precisamos entender os impactos de contaminantes ambientais e tomar medidas preventivas!



StoryboardThat

Image Attributions

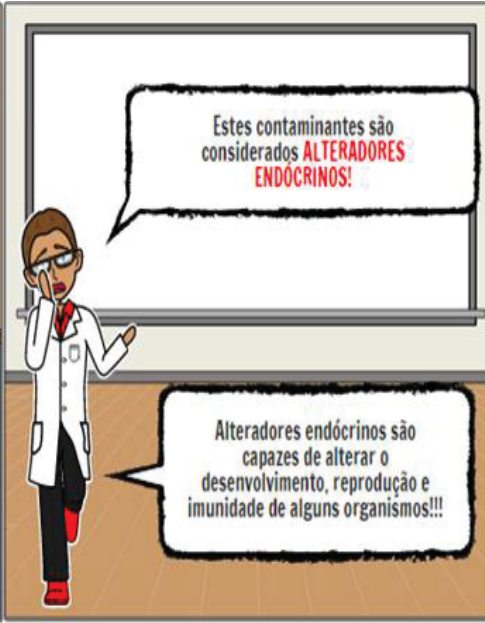
- <https://pixabay.com/illustrations/supermarket-shelf-products-shampoo-1094812/> • Viscious-Speed • Free for Most Commercial Use / No Attribution Required / See <https://pixabay.com/service/license/> for what is not allowed
- <https://pixabay.com/vectors/wastewater-water-pollution-waste-310853/> • Clker-Free-Vector-Images • Free for Most Commercial Use / No Attribution Required / See <https://pixabay.com/service/license/> for what is not allowed
- <https://pixabay.com/photos/treatment-plant-wastewater-refinery-2826990/> • jarmoluk • Free for Most Commercial Use / No Attribution Required / See <https://pixabay.com/service/license/> for what is not allowed
- <https://pixabay.com/vectors/wastewater-effluent-plant-310837/> • Clker-Free-Vector-Images • Free for Most Commercial Use / No Attribution Required / See <https://pixabay.com/service/license/> for what is not allowed
- <https://pixabay.com/photos/tap-black-faucet-kitchen-sink-791172/> • kaboompics • Free for Commercial Use / No Attribution Required (<https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0>)



Renião:

- I. Bisfenol A
- II. Nonilfenol
- III. Octilfenol

Como vimos no capítulo anterior, nosso Lab está estudando três contaminantes ambientais: Bisfenol A, octilfenol e nonilfenol.



Estes contaminantes são considerados **ALTERADORES ENDÓCRINOS!**

Alteradores endócrinos são capazes de alterar o desenvolvimento, reprodução e imunidade de alguns organismos!!!



Mas alteradores endócrinos podem causar outros efeitos aos organismos? E para as plantas, que são uma grande alvo de exposição?

Vamos investigar então os efeitos do bisfenol A, octilfenol e nonilfenol para as plantas em concentração baixas como aquelas que são encontradas no ambiente!

Utilizaremos para essa avaliação a cebola (*Allium cepa*) 😊



Mas por que utilizar a cebola?

Ela é um organismo modelo e algumas características de seu material genético permitem verificar danos nessa molécula tão importante para a vida dos organismos!



Esse teste verifica se o contaminante vai alterar o desenvolvimento das raízes da cebola! Ou seja, avaliamos se são tóxicos "a olho nu"...



E assim, verificamos que baixíssimas concentrações de Bisfenol A, Nonilfenol e Octilfenol não foram tóxicos para as raízes da cebola!

Obaaaa!!!

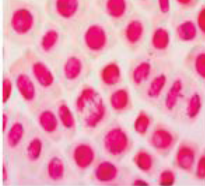
Mas temos que passar por mais um teste, esse é uma análise mais interna... Nas células das cebolas!



Para observar no microscópio óptico...

Primeiro fazemos cortes finíssimos nas raízes da cebola.

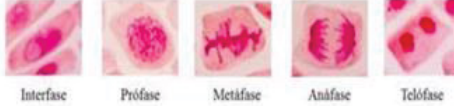
As células!



Assim podemos analisar danos no material genético das células (alterações nos cromossomos) em diferentes fases do ciclo celular.



Fases do ciclo celular



Fases do ciclo celular: uma célula duplica seu material genético (cromossomos), até originar duas novas células!

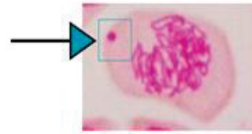
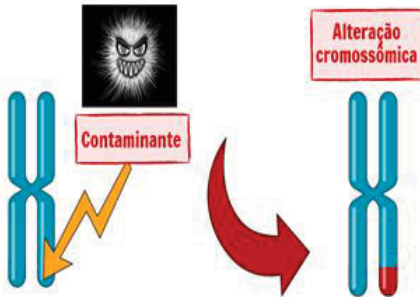


Dentro das células das cebolas nós conseguimos ver os cromossomos!



Obs: Os cromossomos são compostos pelo DNA!

Dessa forma, nós conseguimos observar se os contaminantes induzem alterações nos cromossomos das células das cebolas!

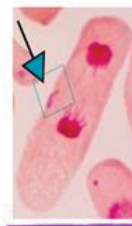


Micronúcleo

Essas imagens são exemplos de alterações cromossômicas!



Pontes cromossômicas



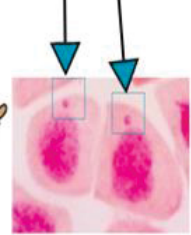
Perda cromossômica



Todas observadas nas células das cebolas que foram expostas ao Bisfenol A, Nonilfenol e Octilfenol. Esses danos podem gerar a morte da célula ou problema no funcionamento da célula!



Quebras cromossômicas



Micronúcleos





 **StoryboardThat**

Image Attributions

- <https://pixabay.com/illustrations/deoxyribonucleic-acid-dns-genetics-1500068/> • geralt • Free for Most Commercial Use / No Attribution Required / See <https://pixabay.com/service/license/> for what is not allowed
- <https://pixabay.com/illustrations/monster-black-and-white-eyes-426996/> • geralt • Free for Commercial Use / No Attribution Required (<https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0>)
- <https://pixabay.com/vectors/genetics-chromosomes-rna-dna-156404/> • OpenClipart-Vectors • Free for Most Commercial Use / No Attribution Required / See <https://pixabay.com/service/license/> for what is not allowed

Figura 5. Capítulo I e II dos quadrinhos *Storyboard*.

Nosso objetivo foi criar e disponibilizar essas ferramentas, além de motivar outras pesquisas a desenvolverem meios de comunicação e divulgação científica para o público leigo e as diferentes pesquisas feitas pelas universidades, elevando a importância disso para a nossa sociedade. Várias universidades do Brasil têm revelado possuir interesse na divulgação científica de pesquisas desenvolvidas na instituição e até alguns possuem parcerias com

programas de comunicação e imprensa, no entanto, isso nem sempre acontece (PESSONI, 2016).

5.2.2. Jogo científico

Jogos de computador possuem potencial de tornar o processo de investigação científica mais envolvente fornecendo um ambiente rico e interativo que desafia o jogador a resolver um problema complexo em um contexto significativo e permite coletar informações e evidências de várias fontes usando ferramentas autênticas (AN et al., 2016), possibilitando tornar nossa preocupação com o meio ambiente uma realidade virtual.

Nos últimos anos, aumentou o interesse por jogos aplicados no auxílio da educação e promoção da divulgação científica, especialmente nas escolas. O trabalho feito por Santos e Silva-Junior (2016) apresentou uma introdução de desafios e oportunidades na virtualização de Games Educacional para auxiliar estudantes e profissionais que desejam investir nessa área.

Beware of the flood e ESLAND são exemplos de jogos voltados para questão de educação ambiental e foram desenvolvidos com o intuito de promover a educação ambiental e o cuidado com a gestão sustentável da paisagem (INVOLEN, 2015). No estudo feito por Souza e Rizatti (2016) foi desenvolvido um jogo de tabuleiro “Trilha da Ciência” para divulgar a ciência, entre temas de solo, água e alimentos em comunidades carentes no Baixo do Rio Branco, Roraima. O autor observou que o jogo contribuiu para o processo de divulgação da ciência entre os participantes da pesquisa.

Com a intensão de combater o tráfico de fósseis e divulgar a importância do registro fóssil, Nunes e Pioker-Hara (2018) promoveram a divulgação científica por meio do público escolar para despertar o interesse pelo acervo fóssil para o conhecimento científico e evolução das plantas. O trabalho teve o objetivo de contribuir tanto para a divulgação do avanço da pesquisa paleobotânica e também da preservação do patrimônio fóssil do Geopark Araripe.

Nosso trabalho também reflete o mesmo propósito de divulgar aos jovens por meio de jogo digital as área de ecotoxicologia e sustentabilidade. O foco é promover o entendimento sobre a origem de produtos químicos, a destinação, os impactos no meio ambiente e para os organismos vivos e como escolher produtos mais sustentáveis. Assim, as figuras abaixo são algumas imagens representativas do jogo de educação científica desenvolvido neste trabalho.

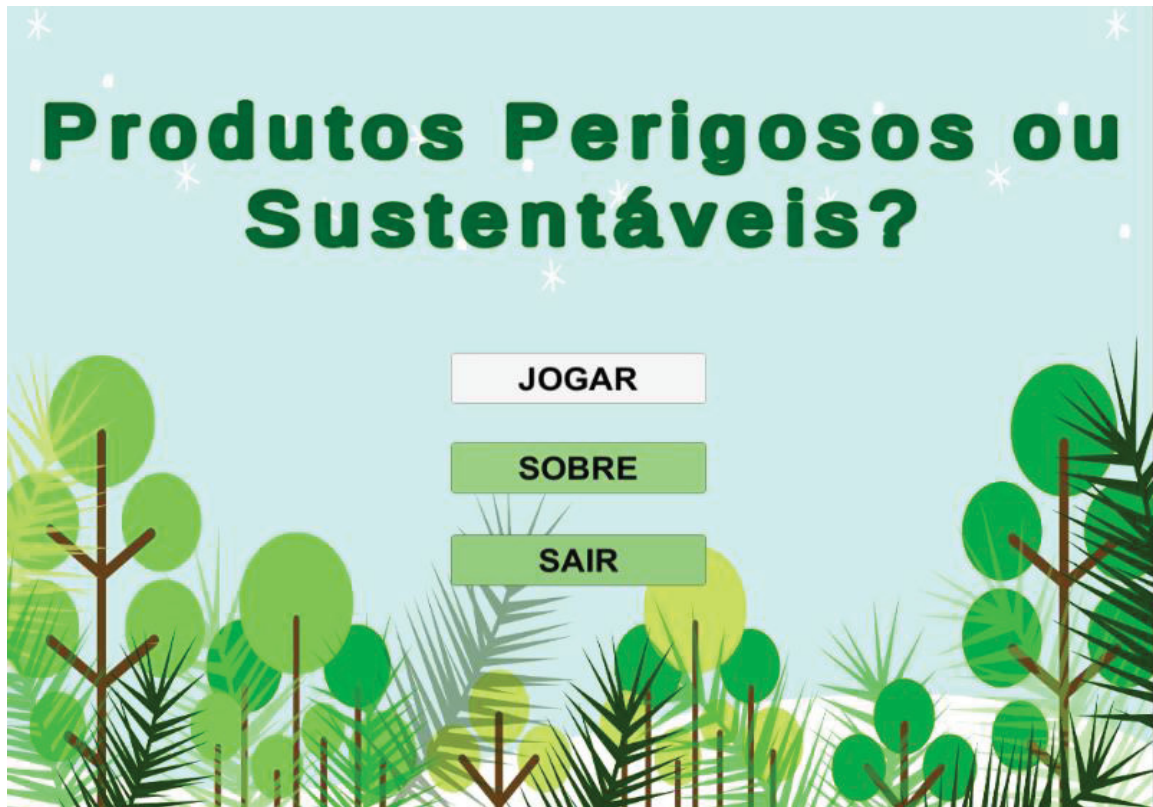


Figura 6. Menu do jogo.

I- Atua no setor produtivo com a criação e inovação de produtos!

INDUSTRIA

DICA CONFERRIR

Pontos: 0

V G C

SAIR



II- No comércio podemos encontrar milhares de produtos industriais que _____ nossa vida de várias formas!

FACILITA

DICA CONFERRIR

Pontos: 10

SAIR N E I



III- Mas qual o destino final destes produtos industriais? Os produtos que utilizamos chegam ao _____ por meio do descarte de efluentes domésticos.

MEIO AMBIENTE

DICA CONFERRIR

Pontos: 20

SAIR



IV- Os efluentes domésticos contêm _____, que podem causar impactos negativos ao meio ambiente.

CONTAMINANTES

DICA CONFERRIR

Pontos: 28

SAIR

BISFENOL A OCTILFENOL NONILFENOL



V- Além de prejudicar o meio ambiente, diferentes _____ também podem ser afetados.

ORGANISMOS

DICA: Seres vivos

CONFERIR

Pontos: 36

SAIR

IA

VI- No entanto, esses impactos podem ser _____ pela avaliação do perigo destes produtos por meio de testes ecotoxicológicos.

PREVENIDOS

DICA: Ou evitar

CONFERIR

Pontos: 44

SAIR

RI

VII- Para isso, diferentes organismos _____ podem ser utilizados para verificar os danos causados por diferentes contaminantes.

BIOLOGICOS

DICA

CONFERIR

Pontos: 54

SAIR

S

T

VIII- Por meio dos testes ecotoxicológicos, podemos verificar quais produtos são menos _____ para o meio ambiente e para os seres vivos.

PREJUDICIAIS

DICA: Pouco ou nada nocivo!

CONFERIR

Pontos: 62

SAIR



Figura 7. Representação das 10 fases do jogo.

O jogo foi desenvolvido em 10 fases, com questões elaboradas a serem respondidas em sequência, frente a um temático problema. Desta forma, visamos promover o conhecimento científico do jogador em aspectos de produção de produtos químicos, seus potenciais impactos ao meio ambiente, a aplicação de testes biológicos para verificar e garantir a segurança do produto e a escolha de produtos menos perigosos ao meio ambiente (sustentáveis). Assim, esperamos contribuir para a divulgação e conscientização de jovens sobre a problemática de uso indevido de produtos químicos do nosso dia a dia, além de promover o entendimento sobre a importância das pesquisas na avaliação ecotoxicológica desses produtos.

Cada fase do jogo, o jogador deve selecionar as letras para formar a palavra correta respectiva da questão apresentada. As imagens do fundo são representativas e, além disso, existe o botão de dicas, porém, se selecionado o valor da pontuação diminui. O jogador recebe 10 pontos por fase e ao errar a palavra, perde pontos também. Assim, no final do jogo poderá

conferir sua pontuação e ler a mensagem motivacional a respeito de como podemos contribuir para um ambiente mais saudável.

Como perspectiva do futuro, temos o propósito de ampliar esse jogo, abordando mais aspectos de educação ambiental e divulgação científica dos estudos (eco)toxicológicos feitos pelas universidades.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que BPA, NP e OF não apresentam toxicidade para o sistema-teste de *A. cepa*, mas apresentam a capacidade de induzir alterações no ciclo celular (redução do IM) e danos no DNA (AC) mesmo em baixas concentrações. Além disso, a exposição a estes contaminantes causou vacuolização citoplasmática, uma alteração morfológica que mostra a atuação do sistema de defesa celular em resposta a toxicantes. Estas alterações foram mais proeminentes nas exposições às formas isoladas do que em mistura. No entanto, ressalta-se que, apesar da exposição em mistura resultar em efeito inibitório quanto as respostas de cito- e genotoxicidade, elas não foram completamente eliminadas e podem também indicar perigo aos sistemas vegetais. Frente aos dados ecogenotoxicológicos obtidos até o momento, BPA, NP e OF, em suas formas isoladas e em misturas, e mesmo em baixas concentrações, podem causar efeitos adversos a sistemas vegetais (monocotiledôneas), no nível celular.

Dado a relevância ambiental e o tema dessa pesquisa ser importante para a sociedade em geral, as ferramentas sugeridas para viabilizar a divulgação deste trabalho a um público não técnico (quadrinhos *Storyboard* e Jogo científico) foram desenvolvidas para a disseminação da ciência à sociedade. Esperamos, assim, que seja possível divulgar os dados deste estudo por meio destas ferramentas, proporcionando a conscientização da população na temática de segurança de produtos e sustentabilidade, que pode levar a *feedbacks* positivos em atitudes e pensamentos.

8. REFERENCIAS

ADAMAKIS, I. D. S.; EMMANUEL PANTERIS, E.; ELEFThERIOU, E. P. Tubulin Acetylation Mediates Bisphenol A Effects on the Microtubule Arrays of *Allium cepa* and *Triticum turgidum*. **Biomolecules**, v. 9, p. 185, 2019.

ADEEL, M.; YANG, Y. S.; WANG, Y.Y.; SONG, X.M.; AHMAD, M. A.; ROGERS, H. J. Uptake and transformation of steroid estrogens as emerging contaminants influence plant development. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1487-1497, 2018.

ALBAGLI, S. Divulgação científica: informação científica para a cidadania?. **Ciência da Informação**, v. 25, p. 396-404, 1996.

AN, Y-J.; HAYNES, L.; D'ALBA, A.; CHUMNEY, F. Using educational computer games in the classroom: Science teachers' experiences, attitudes, perceptions, concerns, and support needs. **Contemporary Issues in Technology & Teacher Education**, v.16, p. 415-433, 2016.

AN, Y-J.; HAYNES, L.; D'ALBA, A.; CHUMNEY, F. Using educational computer games in the classroom: Science teachers' experiences, attitudes, perceptions, concerns, and support needs. *Contemporary Issues in Technology & Teacher Education*, v.16, p. 415-433, 2016.
ANIKINA, O. V.; YAKIMENKO, E. V. Edutainment as a modern technology of education. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 166, p. 475 – 479, 2015.

ANVISA. **Bisfenol A**. Disponível em
<<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/embalagens/bisfenol-a>>. Acesso em 6 set. 2019.

BAI, Y.; LI, X. Y.; LIU Z. J.; ZHANG, Y. H. Effects of octylphenol on the expression of StAR, CYP17 and CYP19 in testis of *Rana chensinensis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p. 9–15, 2017.

BARATA, C.; BAIRD, D. J.; NOGUEIRA, A. J. A., SOARES, A. M. V. M.; RIVA, M. C. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 1–14, 2006.

BENNETT, E.R.; METCALFE, C. D. Distribution of alkylphenol compounds in great lakes sediments, United States and Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 1230–1235, 1998.

BERALDO, D. A. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP.** Dissertação de mestrado (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica). São Carlos, 2012. 79 p.

BIK, H. M.; GOLDSTEIN, M. C. An Introduction to Social Media for Scientists. **PLoS Biology**, 11(4): e1001535, 2013

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, 651-666, 2007.

BRÜGGEMANN, A. J.; FORSBERG, C.; THORNBERG, R. Re-negotiating agency – patients using comics to reflect upon acting in situations of abuse in health care. **BMC Health Services Research**, v. 19, e58, 2019.

BUENO, W. da C. B. Jornalismo científico: revisitando o conceito. In: VICTOR, C.; CALDAS, G.; BORTOLIERO, S. (Org.). Jornalismo científico e desenvolvimento sustentável. **São Paulo: All Print**, 2009. p.157-78.

BULDU, M. Young children's perceptions of scientists: a preliminary study. **Educational Research**, v. 48, p. 121–132, 2006.

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

CAO, Z.; ENGELHARDT, J.; DIERKS, M.; CLOUGH, M. T.; WANG, G.-H.; HERACLEOUS, E.; LAPPAS, A.; RINALDI, R.; SCHÜTH, F. Catalysis Meets Nonthermal Separation for the Production of (Alkyl)phenols and Hydrocarbons from Pyrolysis Oil. **Angewandte Chemie International Edition**, 56, 2334–2339, 2017.

CHEN, H.-J.; GUO, G.-L.; TSENG, D.-H.; CHENG, C.-L.; HUANG, S.-L. Growth factors, kinetics and biodegradation mechanism associated with *Pseudomonas nitroreducens* TX1 grown on octylphenol polyethoxylates. **Journal of Environmental Management**, 80, 279–286, 2006.

CHEN, B-S.; HSIAO, Y-L.; YEN, J-H. Effect of octylphenol on physiologic features during growth in *Arabidopsis thaliana*. **Chemosphere**, v. 93, p. 2264-2268, 2013.

CHEN, B-S.; YEN, J-H. Effect of endocrine disruptor nonylphenol on physiologic features and proteome during growth in *Arabidopsis thaliana*. **Chemosphere**, v. 91, p. 468-474, 2013.

CHUNG, B. S.; KOH, K. S.; OH, C. S.; PARK, J. S.; LEE, J. H.; CHUNG, M. S. Effects of Reading a Free Electronic Book on Regional Anatomy with Schematics and Mnemonics on Student Learning. **Journal of Korean Medical Science**, v. 35, e42, 2020.

CORRALES, I.; POSCHENRIEDER, C. H.; BARCELÓ, J. Boron-induced amelioration of aluminium toxicity in a monocot and a dicot species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 504–513, 2008.

DING, J.; CHENG, Y.; HUA, Z.; CYUAN, C.; WANG, X. The Effect of Dissolved Organic Matter (DOM) on the Release and Distribution of Endocrine-Disrupting Chemicals (Edcs) from Sediment under Hydrodynamic Forces, A Case Study of Bisphenol A (BPA) and Nonylphenol (NP). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, p. 1724, 2019.

DOGAN, M.; YUMRUTAS, O.; SAYGIDEGER, S.D.; KORKUNC, M.; GULNAZ O.; SOKMEN, A. Effects of Bisphenol A and Tetrabromobisphenol A on Chickpea Roots in Germination Stage. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 9, p. 186-192, 2010.

EUROPEAN DIRECTIVE 2003/53/EC, 2003. **Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003 amending for the 26th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement)**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:178:0024:0027:EN:PDF>. Acesso em: 13 ago. 2019.

European Food Safety Authority – EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE (Bisphenol A). **The EFSA Journal**, v. 428, p. 1-75, 2006. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2007.428>>. Acesso em 6 set. 2019.

EPA - U. S. Environmental Protect Agency. Nonylphenol (NP) and Nonylphenol Ethoxylates (NPEs) **Action Plan**. [RIN 2070-ZA09]. 2010.

FELISBINO, K.; SANTOS-FILHO, R.; PIANCINI, L. D. S.; CESTARI, M. M.; LEME, D. M. Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 150, 83-88, 2018.

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

FIORESI, C. A.; CUNHA, M. B. A leitura de textos de divulgação científica e a produção de histórias em quadrinhos. **Manaus**, v.12, n.26, 2019.

FISKESJO, G. Occurrence and degeneration of ‘ Al-structures’ in root cap cells of *Allium cepa* L. after Al-treatment . **Hereditas**, v. 112, p. 193–202, 1990.

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

FÜRHACKER, M.; SCHARF, S.; WEBER, H. Bisphenol A: emissions from point sources. **Chemosphere**, v. 41, p. 751-756, 2000.

GAN, W.; ZHOU, M.; XIANG, Z.; HAN, X.; LI, D. Combined effects of nonylphenol and bisphenol a on the human prostate epithelial cell line RWPE-1. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, p. 4141–4155, 2015.

GRACA, B.; STANISZEWSKA, M.; ZAKRZEWSKA, D.; ZALEWSKA, T. Reconstruction of the pollution history of alkylphenols (4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol) in the Baltic Sea. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 11598–11610, 2016.

HEJMEJ, A.; KOTULA-BALAK, M.; GALAS, J. Effects of 4-tert-octylphenol on the testes and seminal vesicles in adult male bank voles. **Reproductive Toxicology**, v. 31, p. 95–1052, 2011.

HENICS, T.; WHEATLEY, D. N. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: A view on new perspectives and features. **Biology of the Cell**, v. 91, p. 485-498, 1999.

HUANG, J. W.; CUNNINGHAM, S. D. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. **New Phytologist**, v. 134, p. 75-84, 1996.

HUNT, P.; KOEHLER, K.E.; SUSIARJO, M.; HODGES, C.A.; ILAGAN, A.; VOIGT, R. C.; THOMAS, S.; THOMAS, B.F.; HASSOLD, T.J. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. **Current Biology**, v. 13, p. 546-553, 2003.

INVOLEN. **Innovation in Environmental Education: ICT and intergenerational learning. International conference proceedings.** Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Constantina_Skanavis/publication/284720048_Environmental_Education_in_Action_The_Case_Study_of_WWF_School_Program_in_Greece/links/. Acesso em: 15 fev. 2020.

ISOBE, T.; NISHIYAMA, H.; ARISA NAKASHIMA, A.; TAKADA, H. Distribution and Behavior of Nonylphenol, Octylphenol, and Nonylphenol Monoethoxylate in Tokyo Metropolitan Area: Their Association with Aquatic Particles and Sedimentary Distributions. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 1041-1049, 2001.

JADHAV, V. V.; JADHAV, A. S.; CHANDAGADE, C. A.; RAUT, P.D. Genotoxicity of Bisphenol A on Root Meristem Cells of *Allium cepa*: A Cytogenetic Approach. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, v. 9, p. 39–43, 2012.

JARDIM, V. L. **Aplicação dos fungos de podridão branca na degradação de 4 - nonilfenol, 4 - octilfenol e bisfenol - A e avaliação da redução da atividade estrogênica pela linhagem celular MCF.** Tese de Doutorado (doutorado em Engenharia Civil, na área de Saneamento e Ambiente), Campinas, SP, 2017. 120 p.

JAYNE, J. Incorporation of Edutainment Into Intervention and Evaluation: The Jump With Jill (JWJ). **Frontiers in Public Health**, v. 7, e13, 2019.

JILL, J. Incorporation of Edutainment Into Intervention and Evaluation: The Jump With Jill (JWJ) Program. **Frontiers in Public Health**, 7:163. doi: 10.3389/fpubh.2019.00163.

JIN, X.; JIANG, G.; HUANG, G.; LIU, J.; ZHOU, Q. Determination of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in surface waters from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography–mass spectrometry with selected ion monitoring. **Chemosphere**, v. 56, p. 1113–1119, 2004.

JOBLING, S.; SHEAHAN, D.; OSBORNE, J. A.; MATTHIESSEN, P.; SUMPTER, J. P. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 194-202, 1996.

KILANOWSKI, J. F. Agricultural Safety Comic Book for Latinx Migrant Families: Development and Evaluation. **Journal of Pediatric Health Care**, 2020. (In Press). <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2019.11.003>.

KIND, M.; KIND, V. Creativity in Science Education: Perspectives and Challenges for Developing School Science. **Studies in Science Education**, v. 43, p. 1-37, 2007.

LEE, T. I.; SHEU, S. J.; CHANG, H. C.; HUNG, Y. T.; TSENG, L. M.; CHOU, S. S.; LIANG, T. H.; LIU, H. J.; LU, H. L.; CHEN, M. C.; LIU, Y. C.; TSAI, C. S.; SUN, J. C. Developing a Web-Based Comic for Newly Diagnosed Women With Breast Cancer: An Action Research Approach. **Journal of medical Internet research**, v. 21, e10716, 2019.

LEE, Y. M.; SEO, J. S.; KIM, I.C.; YOON, Y.D.; LEE, J. S. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 894–903, 2006.

LEGEAY, S.; FAURE S. Is bisphenol A an environmental obesogen?. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 6, p. 594-609, 2017.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214–219, 2008.

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.

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**, v. 650, p. 80–86, 2008.

LI, X.Y.; LIU, J.; ZHANG, Y. H. Octylphenol induced gene expression in testes of Frog, *Rana chensinensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 75–82, 2016.

de LIMA, G. G.; MENDES, C.; MARCHI, G.; VICARI, T.; CESTARI, M. M.; GOMES, M. F.; RAMSDORF, W. A.; MAGALHÃES, W. L. E.; HANSEL, F. A.; LEME, D. M. The evaluation of the potential ecotoxicity of pyroligneous acid obtained from fast pyrolysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.180; p. 616-623, 2019.

LUO, Z.; TU, Y.; LI, H.; QIU, B.; LIU, Y.; YANG, Z. Endocrine-disrupting compounds in the Xiangjiang River of China: Spatio-temporal distribution, source apportionment, and risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 476-484, 2019.

MATTOS, B. D.; SILVA, L. R.; SOUZA, I. R.; MAGALHÃES, W. L. E.; LEME, D. M.; Slow delivery of biocide from nanostructured; microscaled; particles reduces its phytotoxicity: a model investigation. **Journal of Hazardous Material**, v. 367, p. 513-519, 2019.

MCLEESE, D. W.; ZITKO, V.; SERGEANT, D. B. BURRIDGE, L.; METCALFE, C. D. (1981) Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. **Chemosphere**, v. 10, p. 723–730, 1981.

METZLER, M.; PFEFFER, E. Effects of estrogens on microtubule polymerization in vitro: correlation with estrogenicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 21–22, 1995.

MOYER-GUSÉ, E. Toward a Theory of Entertainment Persuasion: Explaining the Persuasive Effects of Entertainment-Education Messages. **Communication theory**, v. 18, p. 407-425, 2008.

NGUNDI, M. M.; SADIK, O. A.; YAMAGUCHI, T.; SUYE, S. First comparative reaction mechanisms of β -estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 61–67, 2003.

NUNES, L. H. M. N.; PIOKER-HARA, F. C. Detetive paleontológico: o destino dos fósseis de plantas do Geopark Araripe como ferramenta para o ensino das Geociências. **Terrae Didatica**, v.14, p. 5-14, 2018.

OCHI, T. Induction of multiple microtubule-organizing centers, multipolar spindles and multipolar division in cultured V79 cells exposed to diethylstilbestrol, estradiol-17beta and bisphenol A. **Mutation Research**, v. 431, p. 105–121, 1999.

OJO, A. F; PENG, C.; NG, J. C. Combined effects and toxicological interactions of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances mixtures in human liver cells (HepG2). **Environmental Pollution**, e114182, 2020. (In Press).
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114182>.

PAKRASHI, S.; JAIN, N.; DALAI, S.; JAYAKUMAR, J.; CHANDRASEKARAN, P. T.; RAICHUR, A. M.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. In Vivo Genotoxicity Assessment of Titanium Dioxide Nanoparticles by *Allium cepa* Root Tip Assay at High Exposure Concentrations. **Plos one**, v. 9, n. 2, 2014.

PESSONI, A. A divulgação científica nas universidades do grande abc: inovações ou repetições de formatos?. **Comunicação & Informação**, v. 19, n. 1, p. 87-104, 2016. Acesso em: 20 fev. 2020.

PIRŠELOVÁ, B.; KUNA, R.; LIBANTOVÁ, J. et al. Biochemical and physiological comparison of heavy metal-triggered defense responses in the monocot maize and dicot soybean roots. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 3437-3446, 2011.

PRIAC, A.; MORIN- CRINI, N.; DRUART, C.;GAVOILLE, S.; BRADU, C.; LAGARRIGUE, C.; TORRI, G.; WINTERTON, P.; CRINI, G. Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3749-S3773, 2017.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; CONCHA-GRAÑA, E.; TURNES-CAROU, I.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). **Journal of Chromatography A**, v. 1223, p. 1-8, 2012.

SANTOS-FILHO, R.; VICARI, T.; SANTOS, S.A.; FELISBINO, K.; MATTOSO, N.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; CESTARI, M. M.; LEME, D. M. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, p. 425-435, 2019.

SANTOS, W. O.; SILVA-JUNIOR, C. G. An Introduction to Educational Games Virtualization. **SBC – Proceedings of SBGames, XV SBGames – São Paulo – SP – Brazil**, September 8th - 10th, 2016.

SHARMA, V. K.; ANQUANDAH, G. A. K.; YNGARD, R. A.; KIM, H.; FEKETE, J.; BOUZEK, K.; RAY, A. K.; GOLOVKO, D. Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 44, p. 423-442, 2009.

SHEN, W.; LOU, B.; XU, C.; YANG, G.; YU, R.; WANG, X.; LI, X.; WANG, Q.; WANG, Y. Lethal toxicity and gene expression changes in embryonic zebrafish upon exposure to individual and mixture of malathion, chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin. **Chemosphere**, v. 239, e124802, 2020.

SHIMAZAKI, T.; MATSUSHITA, M.; IIO, M.; TAKENAKA, K. Use of health promotion manga to encourage physical activity and healthy eating in Japanese patients with metabolic syndrome: a case study. **Archives of Public Health**, v. 76, e26, 2018.

SIGURNJAK, M.; UKIĆ, Š.; CVETNIĆ, M.; MARKIĆ, M.; NOVAK-STANKOV, M.; RASULEV, B.; KUŠIĆ, H.; BOŽIĆ, A. L.; ROGOŠIĆ, M.; BOLANČA, T. Combined toxicities of binary mixtures of alachlor, chlorfenvinphos, diuron and isoproturon. **Chemosphere**, e12497, 2020.

SILVA, S. W. **Fotoeletrooxidação na degradação de nonilfenol etoxilado em águas residuárias**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais). UFRGS. Porto Alegre, RS. 2013. 90 p.

SONE, K.; HINAGO, M.; KITAYAMA, A.; MOROKUMA, J.; UENO, N.; WATANABE, H.; IGUCHI, T. Effects of 17 β -estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. **General and Comparative Endocrinology**, v. 138, p. 228–236, 2004.

SOUZA, I. R. **Avaliação toxicológica de nanopartículas de prata encapsuladas e não encapsuladas por meio do teste de *Allium cepa* na ausência e presença de luz**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Genética), Curitiba, PR, 2018. 91 p.

SOUZA; I. R.; SILVA; L. R.; FERNANDES; L. S. P.; SALGADO; L. D.; ASSIS; H. C. S.; FIRAK; D. S.; BACH; L.; SANTOS-FILHO; R.; VOIGT; C. L.; BARROS; A. C.; PERALTA-ZAMORA; P.; MATTOSO; N.; FRANCO; C. R. C.; MEDEIROS; L. C.; MARCON; B. H.; CESTARI; M. M.; SANT'ANNA-SANTOS; B. F.; LEME; D.M. Visible-light reduced silver nanoparticles' toxicity in *Allium cepa* test system. **Environmental Pollution**, v. 257; e113551, 2020.

SOUZA, J. S.; RIZATTI, I.M. **Na trilha da Ciência**. Boa Vista, Roraima: UERR, 2016. Disponível em: <<https://uerr.edu.br/ppgec/wp-content/uploads/2015/08/JOGO-NA-TRILHA-DA-CIENCIA.pdf>>. Acesso em 24 fev. 2020.

SPADOTO, M. **Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do bisfenol A em organismos de água doce**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013. 118 p.

STEWART, A. J.; STEWART, R. F. Phenols. In Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, **Encyclopedia of Ecology**, ed by JORGENSEN, S. E. AND FATH, B. p. 2682-2689, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00417-1>.

SUN, L.; ZHA, J.; WANG, Z. Interactions between estrogenic chemicals in binary mixtures investigated using vitellogenin induction and factorial analysis. **Chemosphere**, 75, 410–415, 2009.

SUPREMO TRIBUNAL FEDERAL. **Suspensão de Segurança 5.230 Rio Grande do Sul**. Disponível em: <http://portal.stf.jus.br/processos/downloadPeca.asp?id=314292919&ext=.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2020.

TAYAMA, S.; NAKAGAWA, Y.; TAYAMA, K. Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. **Mutation Research**, v. 649, p. 114–125, 2008.

TSUDA, T.; TAKINO, A.; KOJIMA, M.; HARADA, H.; MURAKI, K.; TSUJI, M. 4-Nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. **Chemosphere**, v. 41, p. 757-762, 2000.

WANG, H.; SINGHAL, A. East Los High: Transmedia Edutainment to Promote the Sexual and Reproductive Health of Young Latina/o Americans. **American Journal of Public Health**, v. 106, p. 1002-10, 2016.

WANG, S.; WANG, L.; HUA, W.; ZHOU, M. Effects of bisphenol A, an environmental endocrine disruptor, on the endogenous hormones of plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 17653–17662, 2015.

ZHANG, H.; ZHANG, Y.; LI, J.; YANG, M. Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China. **Science of The Total Environment**, v. 655, p. 607-613, 2019.

ZHOU, Q.; LEI, M.; LI, J.; ZHAO, K.; LIU, Y. Sensitive determination of bisphenol A, 4-nonylphenol and 4-octylphenol by magnetic solid phase extraction with Fe@MgAl-LDH magnetic nanoparticles from environmental water samples. **Separation and Purification Technology**, v. 182, p. 78-86, 2017.

ANEXO

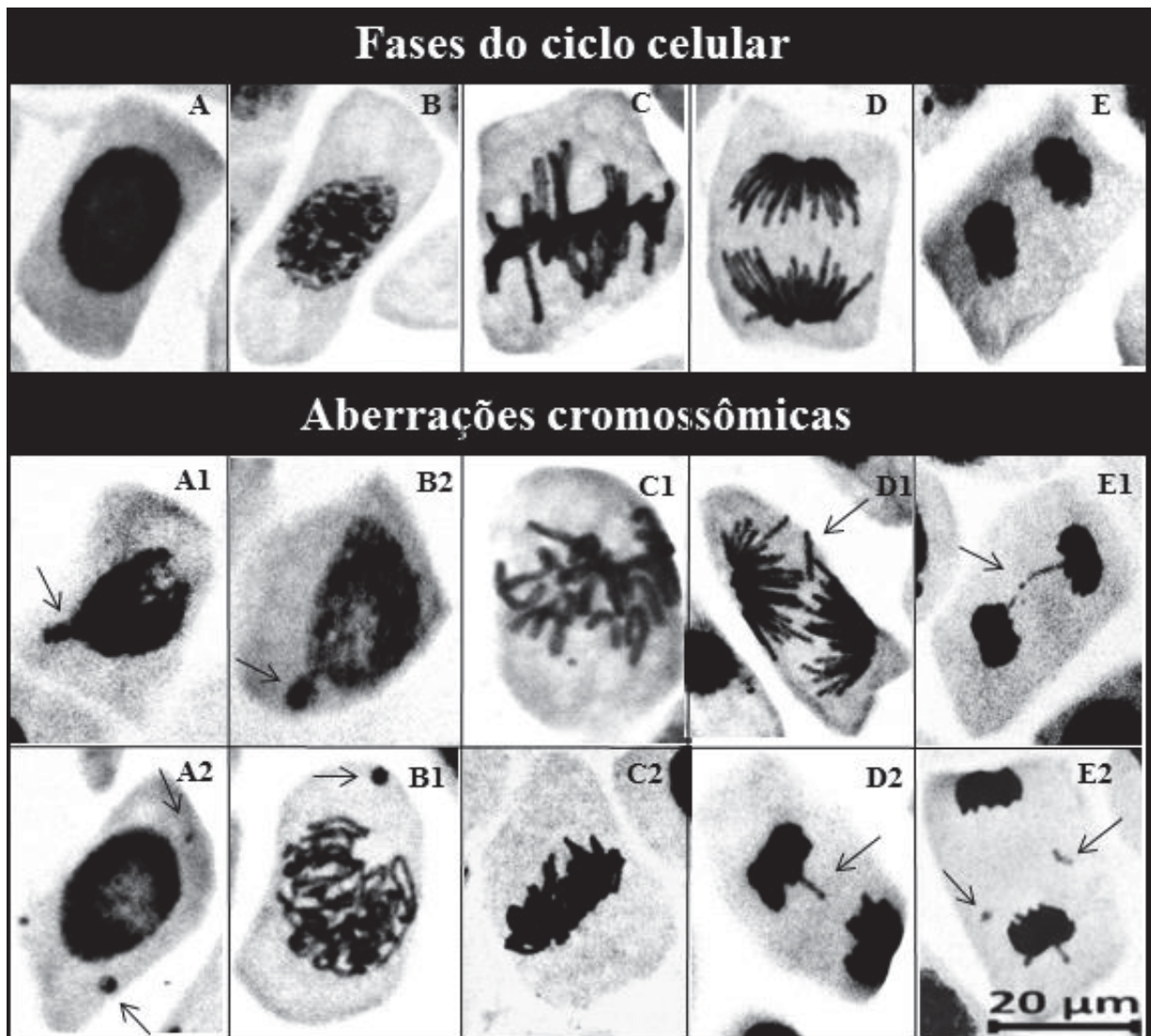


Figura 8. Aberrações cromossômicas nas diferentes fases do ciclo celular observadas nas células meristemáticas de *A. cepa*. **A:** Interfase. **A1:** Broto nuclear. **A2:** Micronúcleos. **B:** Prófase. **B1:** Micronúcleo. **B2:** Broto nuclear. **C:** Metáfase. **C1:** C-Metáfase. **C2:** Aderência cromossômica. **D:** Anáfase. **D1:** Perda cromossômica. **D2:** Atraso cromossômico. **E:** Telófase. **E1:** Ponte cromossômica e ruptura. **E2:** Quebras cromossômicas. Foto retirada no Microscópio AxioLab A1 Zeiss no aumento de 40x.