



ESCOLA SUPERIOR DE  
TECNOLOGIA DA SAÚDE  
DE LISBOA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



INSTITUTO  
POLITÉCNICO  
DE LISBOA

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**Efeitos citotóxicos e genotóxicos da exposição individual e  
combinada de nanopartículas de poliestireno e Bisfenol A na linha  
celular GP202- Um estudo piloto *in vitro***

Cláudia Bernardete da Silva Semedo de Brito

**Orientadores:** Doutora Carina Alexandra Ladeira- Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL), Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC)

Doutor Luís André Mendes, Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC), Grupo de Ecología Animal, Faculdade de Biología, Universidade de Vigo (UVigo)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais  
(esta versão inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, setembro, 2023

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**Efeitos citotóxicos e genotóxicos da exposição individual e combinada de nanopartículas de poliestireno e bisfenol A na linha celular GP202- Um estudo piloto *in vitro***

Cláudia Bernardete da Silva Semedo de Brito

**Orientadores:** Doutora Carina Alexandra Ladeira- Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL), Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC)

Doutor Luís André Mendes, Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC), Grupo de Ecología Animal, Faculdade de Biología, Universidade de Vigo (UVigo)

**Júri:**

Presidente: Doutora Edna Ribeiro - Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa (ESTeSL), Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC)

Arguente: Doutor Vasco Rui Branco - Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Mestrado em Tecnologia Clínico-Laboratorial  
(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, setembro de 2023



Mestrado em  
Tecnologias  
Clínico-Laboratorial

**Efeitos Citotóxicos e genotóxicos da exposição individual e combinada de Nanopartículas de poliestireno e Bisfenol A na linha celular GP202- Um estudo piloto *in vitro***

Cláudia  
Bernardete da  
Silva Semedo  
de Brito

**2023**

## **Declaração**

Declaro ser a autora deste trabalho, o qual completa o ciclo de estudos exigido para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Clínico-laboratorial, sendo este original e inédito nunca submetido, parcial ou integralmente a outra instituição de ensino superior para obtenção de grau académico ou qualquer outra habilitação. Os autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da lista de referências incluída. Declaro ainda que tenho consciência de que o plágio poderá levar à anulação do trabalho agora submetido.

/Cláudia Bernardete Silva Semedo de Brito/

Lisboa, setembro de 2023

**ESTE PROJETO RECEBEU FINANCIAMENTO DO CONCURSO DE INVESTIGAÇÃO,  
DESENVOLVIMENTO, INOVAÇÃO E CRIAÇÃO ARTÍSTICA (IDI&CA) COM A  
REFERÊNCIA IPL/2021/PLASCOGEN\_ESTeSL**



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, aos meus orientadores, Professora Doutora Carina Alexandra Ladeira por ter me dado esta oportunidade de integrar nesse projeto e Doutor Luís Mendes por terem aceitado este desafio e pelo apoio, paciência, ensinamentos e disponibilidade ao longo do dessa dissertação. Agradecer-lhes, acima de tudo, pela orientação, pela partilha de saber científico, pela motivação e confiança ao longo desse processo.

A Professora Doutora Edna Ribeiro e professora Doutora. Ana Marques Ramos pela partilha de saber e acompanhamento nas partes praticas.

A minha Filha Vanessa, por compreenderem a minha ausência, para poder me dedicar à realização dessa dissertação e por ser sempre a minha maior fonte de inspiração e motivação para concluir essa dissertação

Agradeço ao Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC), pelo espaço concebido, pela disponibilização dos equipamentos e logística que foram fundamentais para a elaboração deste trabalho.

A todos aqueles que toleram e contribuíram, de alguma forma, para a concretização deste trabalho, em diferentes fases, e que, sem o apoio, incentivo, confiança, disponibilidade e ensinamentos não teria conseguido alcançar este desafio.

Muito Obrigado

“Recomeça... se puderes, sem angústia e sem pressa e os passos que deres, nesse caminho duro do futuro, dá-os em liberdade, enquanto não alcances, não descanses”

**Miguel Torga**

## Resumo

Atualmente, devido ao massivo uso comum de plásticos com diferentes formas e tamanhos, é inevitável a entrada no organismo de nanoplásticos (NPs) e aditivos tal como plasticizantes como Bisfenol A (BPA), de forma independente ou em misturas. Existe evidência científica da exposição via oral e de absorção em tecidos gástricos destes poluentes. Isto, em conjugação com a capacidade de NPs de atuar como vetor de outros, leva a que o potencial tóxico seja bastante elevado. Como tal, é necessário avaliar o impacto a nível celular e sub-celular, prevendo as consequências a nível de tecido, órgão e organismo a longo prazo.

O objetivo desse estudo *in vitro*, foi investigar os efeitos citotóxicos, e genotóxicos, da exposição individual e combinada de BPA e nanopartículas de polistireno (PS-NPs), na linha celular gástrica GP202. Foram selecionadas concentrações ambientais relevantes e previamente testadas em literatura, para as PS-NPs - 20, 100 e 200 µg/mL e para o BPA - 0,04, 0,1 e 1 ng/mL, sendo que 0,04 ng/mL, é o valor de referência proposta pela EFSA. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio de Cell Titer- Blue® e a genotoxicidade, nomeadamente danos no DNA, foi investigada através do ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocineses (CBMN), de acordo com a *Guideline 487* da OCDE.

Os resultados apontam que a citotoxicidade não é afetada pelas exposições individuais ou combinadas de PS-NPs e BPA. Relativamente a genotoxicidade, verificou-se um aumento estatisticamente significativo de todos os parâmetros investigados: micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (NBPs) e protusões nucleares (NBUDs), nas exposições combinadas nas concentrações mais elevadas (200 µg/mL de PS-NPs + 1 ng/mL de BPA) em comparação com o controlo negativo. Os resultados desta investigação justificam a necessidade de realizar mais estudos com exposições combinadas de NPs e BPA, de forma a desenvolver, realizar e avaliar os riscos de misturas químicas.

**Palavra-Chave:** Nanopartículas de poliestireno, Bisfenol A, células gástricas GP202 citotoxicidade, genotoxicidade, *in vitro*, exposição combinada.

## Abstract

Nowadays, due to the massive use of plastics with different shapes and sizes, it is inevitable that nanoplastics (NPs) and its additives such as plasticizers as Bisphenol A (BPA), enter the body as single substances or mostly as a mixture. There is scientific evidence of oral exposure and absorption of these substances in gastric tissues. This, in conjunction with the NPs ability to act as a vector for other pollutants, results in a quite high toxic potential. As such, there is the need to assess the impact at cellular and sub-cellular level, predicting the consequences on tissue, organ and organism level in the long-term.

The aim of this *in vitro* study was to investigate the cytotoxic and genotoxic effects of the individual and combined exposure of BPA and polystyrene (PS)-NPs in the GP202 gastric cell line. Environmental relevant concentrations previously tested in literature were selected, for PS-NPs – 20, 100 and 200 µg/mL and for BPA – 0,04, 0,1 e 1 ng/mL, and 0,04 ng/mL, is the reference value proposed by EFSA. Cytotoxicity was assessed by Cell Titer- Blue® assay and genotoxicity by cytokinesis-block micronucleus assay, following OECD *Guideline* 487.

The results indicate that cytotoxicity is not affected by individual or combined exposures of PS-NPs and BPA. Regarding genotoxicity it was observed that all the endpoints – micronucleus, nucleoplasmic bridges and nuclear buds – were statistically significant increased in the worst case-scenario of combined exposure (200 µg/mL PS NPs + 1 ng/mL BPA) compared with the negative control. These results justify the need for further studies with combined exposures of NPs and BPA in order to develop, carry out and evaluate the safety risks of chemical mixtures.

**Key words:** Polystyrene nanoparticles, bisphenol A, gastric cell GP202, citotoxicity, genotoxicity, *in vitro*, combined exposures



## Índice geral

<b>Declaração</b> .....	VI
<b>Agradecimentos</b> .....	IX
<b>Abstract</b> .....	XII
<b>Índice geral</b> .....	XIV
<b>Índice de figura</b> .....	XVIII
<b>Índice de tabelas</b> .....	XXI
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	XXIII
<b>Introdução</b> .....	1
<b>1.1. Produção e libertação de plásticos para o ambiente</b> .....	1
<b>1.2- Libertação e Presença de Bisfenol A no ambiente</b> .....	1
<b>1.3- Vias de exposição oral</b> .....	2
<b>1.4- Impacto das nanopartículas de poliestireno na saúde humana</b> .....	2
<b>1.5- Impacto do Bisfenol A na saúde humana</b> .....	3
<b>1.6- Importância de estudos com células gástricas e misturas químicas</b> .....	3
<b>1.6- Questão de partida/investigação</b> .....	4
<b>1.7- Hipótese</b> .....	4
<b>2- Objetivos</b> .....	5
<b>2.1- Objetivos gerais</b> .....	5
<b>2.3- Objetivos específicos</b> .....	5
<b>3- Enquadramento teórico</b> .....	6
<b>3.1- Plástico- Produção e libertação no meio ambiente</b> .....	6
<b>3.2- Classificação de partículas plásticas</b> .....	7
<b>3.3- Características e tipos de plástico</b> .....	9
<b>3.4- Plastificantes</b> .....	10
<b>3.5- Rotas de plásticos no ambiente</b> .....	10
<b>3.6- Exposição de humanos a plásticos</b> .....	11
<b>3.7- Poliestireno</b> .....	12
<b>3.7.1. Classificação Toxicológica do poliestireno</b> .....	13

3.7.2.	<b>Efeito de PS-NPs na saúde humana e sistema gastrointestinal</b> .....	13
3.8.	<b>Bisfenol A</b> .....	17
3.8.1.	<b>Presença de Bisfenol A em humanos</b> .....	19
3.8.2.	<b>Classificação Toxicológica de BPA</b> .....	20
3.8.3.	<b>Efeito de BPA na saúde humana e sistema gastrointestinal</b> .....	21
3.9-	<b>O efeito toxicológico da exposição combina de NPs e BPA</b> .....	24
3.10-	<b>Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias químicas e misturas</b> .....	26
3.10.1.	<b>Ensaio de Citotoxicidade</b> .....	26
3.10.2.	<b>Genotoxicidade</b> .....	28
3.10.3-	<b>Células Gástricas GP202</b> .....	30
4-	<b>Metodologia</b> .....	30
4.1-	<b>Tipo de Estudo</b> .....	31
4.2-	<b>Local de estudo</b> .....	31
4.3-	<b>Variáveis</b> .....	31
4.4-	<b>Procedimentos laboratoriais</b> .....	31
4.4.1-	<b>Cultura celular</b> .....	31
4.4.2-	<b>Tratamento/ Exposição química</b> .....	34
4.4.3-	<b>Preparação da Solução química</b> .....	34
4.4.4-	<b>Avaliação de Efeitos</b> .....	37
4.5-	<b>Tratamento estatístico</b> .....	43
4.6-	<b>Considerações éticas e legais</b> .....	43
5-	<b>Resultados</b> .....	44
5.1-	<b>Citotoxicidade</b> .....	44
5.1.1-	<b>BPA</b> .....	44
5.1.2-	<b>PS-NPs</b> .....	45
5.2-	<b>Genotoxicidade</b> .....	45
5.2.1-	<b>Exposição combinada de PS-NPs e BPA</b> .....	45
6-	<b>Discussão</b> .....	48

<b>6.1. Viabilidade celular após exposição a PS-NPs .....</b>	<b>48</b>
<b>6.2. Viabilidade celular após exposição a BPA .....</b>	<b>49</b>
<b>6.3. Viabilidade celular após exposição combinada.....</b>	<b>50</b>
<b>6.4. Genotoxicidade após exposição combinada.....</b>	<b>50</b>
<b>6.5. Mecanismos de Toxicidade.....</b>	<b>51</b>
<b>7- Conclusão.....</b>	<b>54</b>
<b>8- Referências bibliográficas .....</b>	<b>55</b>



## Índice de figura

<b>Figura 3.1:</b> Produção de plástico: A: Produção mundial de plástico. B: Produção de plástico na Europa. <b>Fonte:</b> (Plastics - the Facts, 2021).....	7
<b>Figura 3.2:</b> Fonte e destino de Micro e nanopartículas primária e secundária no meio ambiente. <b>Fonte:</b> Adaptação (Yee et al., 2021).....	8
<b>Figura 3.3:</b> Estrutura, modificação e características da espinha dorsal de resinas comuns: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), politetrafluoretileno (PTFE), policloreto de vinil (PVC), politereftalato de etileno. (PET). <b>Fonte:</b> Adaptação (Schröter & Ventura, 2022). .....	9
<b>Figura 3.4:</b> Ciclo de plástico, <b>Fonte:</b> (Bank & Hansson, 2019; Rochman, 2018).....	11
<b>Figura 3.5:</b> Efeitos de PS-MPs e SP-NPs no organismo. <b>Fonte:</b> Adaptação (Sangkham et al., 2022).....	15
<b>Figura 3.6:</b> Via de exposição MNPs oral e seus potenciais efeitos tóxicos no sistema gastrointestinal. <b>Fonte:</b> Adaptação (Sangkham et al., 2022). ....	17
<b>Figura 3.7:</b> Estrutura química do Bisfenol A (4,4´-(propano-2,2-diil) difenol). <b>Fonte:</b> (Sarria-Villa et al., 2019).....	19
<b>Figura 3.8:</b> Ensaio CellTiter-Blue®. <b>A:</b> Protocolo: envolve a adição de um único reagente (CellTiter-Blue® Reagent) diretamente às células cultivadas em meio suplementado com soro. Após uma etapa de incubação, os dados são registados utilizando um fluorómetro ou espectrofotómetro <b>B:</b> A conversão da resazurina em resorufina por células metabolicamente ativas resulta na geração de um produto fluorescente. <b>C e D:</b> Propriedades espectrais da resazurina e resorufina em RPMI + 10% de soro fetal bovino: <b>C</b> (Absorvência espectros para resazurina e resorufina); <b>D:</b> (Espectros de excitação e emissão de fluorescência para resorufina). <b>Fonte:</b> (Promega, 2019).....	27
<b>Figura 3.9:</b> Biomarcadores do dano de DNA, através do ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN) Formação do micronúcleo. <b>A:</b> Micronúcleo (MN); <b>B:</b> Ponte nucleoplasmático (NPB); <b>C:</b> Protusão nucleares (NBUD). <b>Fonte:</b> <b>Adaptação</b> (Fenech et al., 2011). ....	29
<b>Figura 3.10:</b> Formação de micronúcleo. <b>Fonte:</b> Adaptação (Fenech et al., 2011).....	29
<b>Figura 4.11:</b> Desenho do estudo experimental in vitro. ....	30
<b>Figura 4.12:</b> Células GP202 24h após descongelamento (10x), com a morfologia hexagonal das células epiteliais. <b>Fonte:</b> ( <a href="https://www.ipatimup.pt/FileMgr/DownloadFile.aspx?SelectedNodeId=2327">https://www.ipatimup.pt/FileMgr/DownloadFile.aspx?SelectedNodeId=2327</a> ), cessado no dia 27 de fevereiro de 2023.....	33

<b>Figura 4.13:</b> Matérias e reagentes. <b>A:</b> Câmara de fluxo laminar. <b>B:</b> Matérias e reagentes utilizados para a cultivo de célula GP 202, sobre a câmara de fluxo laminar. <b>Foto</b> Inédita ...	34
<b>Figura 4.14:</b> Preparação da solução química e exposição individual e combinada de PS-NPs e BPA. A:PS-NPSe BPA dissolvidas em concentrações finais de PS-NPs e BPA. B: As exposições individuais e combinadas de PS-NPs e BPA, em placa de 96 poço. <b>Fonte:</b> Fotos inéditas.....	38
<b>Figura 4.15:</b> Contagem de células viáveis na câmara de Neubauer, no microscópio invertido. <b>A:</b> Microscópio Invertido; <b>B:</b> Visualização das células na Câmara de Neubauer; <b>C:</b> Regras de contagem de células, na câmara de Neubauer. <b>Fonte:</b> Foto inédita. ....	39
<b>Figura 4.16:</b> Mapeamento em placa de 96 poços da exposição individual de BPA:de 1ng/mL (BPA <sub>1</sub> ), 0,1ng/mL (BPA <sub>2</sub> ) e 0,04ng/mL (BPA <sub>3</sub> ), e de PS-NPs: 200 µg/mL (PS-NPs <sub>1</sub> ), 100µg/mL (PS-NPs <sub>2</sub> ), 20µg/mL (PS-NPs <sub>3</sub> ),e exposição combinadas de BPA/PS-NPs: 1µg/mL/200µg/mL (BPA <sub>1</sub> /PS-NPs <sub>1</sub> ), 0,1ng/mL/200µg/mL (BPA <sub>2</sub> /PS-NPs <sub>1</sub> ), 0,04 ng/mL/200µg/mL (BPA <sub>3</sub> /PS-NPs <sub>1</sub> ) e PS-NPs/BPA: 100 µg/mL/1ng/mL (PS-NPs <sub>2</sub> /BPA <sub>1</sub> ) e 200 µg/mL/1 ng/m (PS-NPs <sub>1</sub> /BPA <sub>1</sub> ), durante 24 horas para o ensaio da avaliação da viabilidade na linha celular gástricas GP202.....	40
<b>Figura 4.17:</b> Placa 96 poços após a exposição individual de BPA: 1ng/mL (BPA <sub>1</sub> ), 0,1ng/mL (BPA <sub>2</sub> ) e 0,04ng/mL (BPA <sub>3</sub> ), e PS-NPs: 200 µg/mL (PS-NPs <sub>1</sub> ), 100µg/mL (PS-NPs <sub>2</sub> ), 20µg/mL PS-(NPs <sub>3</sub> ),e exposição combinadas de BPA/PS-NPs:1ng/mL/200µg/mL (BPA <sub>1</sub> /PS-NPs <sub>1</sub> ), 0,1ng/mL/200µg/mL (BPA <sub>2</sub> /PS-NPs <sub>1</sub> ), 0,04 ng/mL/200µg/mL (BPA <sub>3</sub> /PS-NPs <sub>1</sub> ), 100 µg/mL/1ng/mL (NPs <sub>2</sub> /PS-BPA <sub>1</sub> ) e 200 µg/mL/1 ng/m (NPs <sub>1</sub> /BPA <sub>1</sub> ), durante 24 horas para o ensaio da avaliação da viabilidade na linha celular gástricas GP202. <b>Fonte:</b> Foto inédita ...	40
<b>Figura 4.18:</b> placa 24 poço com a exposição combinada de 1 ng/mL de BPA e 200 µg/mL de PS-NPs1 nas gástricas humanas GP202 para ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN). ....	42
<b>Figura 4.19:</b> lâminas coloradas com a solução Giemsa para ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN). <b>Fonte:</b> Foto Inédita. ....	42
<b>Figura 5.20:</b> Avaliação dos efeitos da viabilidade celular na linha celular GP202, após 24 h de exposição individual a BPA nas concentrações de 0,04, 0,1 e 1ng/mL e combinadas com 200 µg/mL de PS-NPs. Os resultados foram apresentados como percentagem do número de células viáveis na condição controlo, sem adição de BPA ou veículo. Foram feitas 3 réplicas biológicas e os resultados apresentados como média e o erro padrão das 3 replicas. ....	44
<b>Figura 5.21:</b> Avaliação dos efeitos da viabilidade celular na linha celular GP202, após 24 h de exposição individual de PS-NPs nas concentrações 20,100 e 200 µg/mL e combinadas com 1ng/mL de BPA. Os resultados foram apresentados como percentagem do número de células viáveis na condição controlo, sem adição de PS-NPs. Foram feitas 3 réplicas biológicas e os resultados apresentados como média e o desvio padrão das 3 replicas. ....	45

**Figura 5.22:** Avaliação dos efeitos da genotoxicidade na linha celular GP202, através do ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN), após 24 h de exposição combinada de 200 µg/mL de PS-NPs e 1 ng/mL de BPA. **A:** Avaliação do MN, MN, NPBs e NBUDs em 500 células binucleadas observadas; **B:** Índice de Proliferação de Blocos de Citocinese (CBPI). Foram feitas 3 réplicas biológicas e os resultados obtidos apresentados como a média e o erro padrão.....46

**Figura 5.23:** Danos no DNA na linha celular GP202, avaliada através do ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN), após 24 h de exposição combinada de 200 µg/mL de PS-NPs e 1 ng/mL de BPA; **A:** Controle negativo (-), Células mono e binucleada; **B:** Células expostas a PS-NPs + BPA, Células Binucleada com Micronúcleo (MN) e Pontes Nucleoplasmáticas (NPB); e **C** Células expostas a PS-NPs + BPA, células binucleadas com MN e células multinucleada com MN; **D:** controle positivo (+), Células multinucleada com protusões nucleares (NBUD) e MN. Fotos Inéditas .....47

## Índice de tabelas

<b>Tabela 3.1:</b> Classificação dos detritos plásticos com base em seu tamanho e forma. <b>Fonte:</b> Adaptação (Sangkham et al. 2022) .....	8
<b>Tabela 4.2:</b> Variáveis dependentes e independentes. ....	31
<b>Tabela 4.3:</b> Características da linha celular GP202 (RRID: CVCL_S967). Fonte:(Gärtner et al. 1996).....	33
<b>Tabela 4.4:</b> Concentrações de BPA utilizadas para ensaio de Cell Titer e MN.....	35
<b>Tabela 4.5:</b> Concentrações de PS-NPs utilizadas para ensaio de Cell Titer e MN.....	36
<b>Tabela 4.6:</b> Concentrações combinadas de BPA/PS-NPs utilizadas para ensaio de Cell Titer e MN. ....	37



## Lista de abreviaturas

- ADI-** Ingestão diária aceitável
- AGS-** Células de adenocarcinoma
- ASAE-** Autoridade de segurança alimentar económica
- ATP-** Trifosfato de adenosina
- BPA-DG-** Diglucuronido de BPA
- BPA-DS-** Dissulfato de BPA
- BPA-G-** Glucuronido de BPA
- BPA-MG-** Monoglucuronido de BPA
- BPA-MS-** Monossulfato de BPA
- BPA-S-** Sulfato de BPA
- BPL-** Boas práticas de laboratório
- Caco-2** – Células de adenocarcinoma colorretal humano
- CAGR-** Taxa de crescimento anual composta
- CBMN-** Ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese
- CRT-** Creatinina
- DDA-** Dose diária admissível
- CDC-** Centros de Controle e Prevenção de Doenças
- DLD-1-** Linha celular de cancro de cólon
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DOX-** Doxorrubicina
- CBPI-** índice de proliferação de bloqueio de citocinese
- CE50-** Concentração efetiva de 50%
- CIIT-** Instituto de Toxicologia da Indústria Química
- Cm<sup>2</sup>** - Centímetro quadrado

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**° C** - Graus Celsius

**cytoB**: citocalasina B

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**EDCS**- Desreguladores endócrinos

**ECHA**: Agência de produtos químicos europeia

**EDTA** - Ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico

**EPA**- Agência de Proteção Ambiental

**EFSA**: Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

**ESTeSL** - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

**ER**- Recetor de estrogénio

**UE**- União europeia

**F-actina**- Fator actina

**FBS**- Soro fetal bovino

**FDA**- Administração de Alimentos e Medicamentos

**FTIR**: Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier

**g** – Grama

**GPR**- Recetor acoplado à proteína

**GPx**- glutationa peroxidase

**GP202**- Células de carcinoma gástrico primário difuso

**h** - Horas

**HCl** - Ácido clorídrico

**HCT116**- Células de carcinoma colorretal humano

**HT-29**- Células de adenocarcinoma colorretal humano

**H&TRC**- Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia

**H<sub>2</sub>O**- Água

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**IARC**- Agência Internacional de Pesquisa de Cancro

**IL** – Interleucina

**IL-1 β**- Interleucina Beta

**IL-6**- Interleucina 6

**IL-8**- Interleucina 8

**IFN-γ**- Interferon-gama

**Ipatimup**- Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

**Kg**- Quilogramas

**L**- Litro

**LOAEL**- Nível mais baixo de efeitos adversos observados

**LS-174T** - Células de adenocarcinoma do cólon

**M** - Molar

**m<sup>3</sup>**- Metro cúbico

**MAPs**- Macroplásticos

**MBP**- 4-metil-2,4-bis (4-hidroxifenil) pent-1-eno

**ml**- Mililitro

**mm**- Milímetro

**NMDR**- Resposta de dose não monotónica

**Min** - Minutos

**MNPs**- Micro e nano partículas

**Hep-2**- Epiteliais humanas tipo 2

**MRA**- Avaliação do Risco de Mistura

**MN**- Micronúcleos

**MNvit**- Ensaio *in vitro* de micronúcleos

**MPs**- Micropartículas ou micro plásticos

**MRC-5**- Fibroblastos pulmonares

**MSPs**- Mesoplásticos

**MTT**- [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

**NaCl** - Cloreto de sódio

**NaHCO<sub>3</sub>** - Bicarbonato de sódio

**NaOH** - Hidróxido de sódio

**NBUDs**- Protusões nucleares

**NCTR** -Centro Nacional de Pesquisa Toxicológica

**NHANES**- Pesquisa Nacional de Exame de Saúde e Nutrição

**NPs**- Nanopartículas

**NPB**- Pontes nucleoplasmáticas

**Ng**- Nanogramas

**nm**- Nanómetro

**O<sub>2</sub>** -Oxigénio

**OCDE**- Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico

**OMS/WHO**-Organização mundial de saúde

**PBDEs**- Éteres difenílicos polibromados

**PBS** - Solução salina de fosfato tamponada

**PC**- Peco corporal

**PE**- Polietileno

**PET**- Polietileno tereftalato

**PFTE**- Politetrafluoretileno

**pH** - Potencial hidrogeniónico

**pg**- Picograma

**POPs**- Poluentes orgânicos persistente

**ppm**- Partes por milhões

**PP**- Polipropileno **PS**- Poliestireno

**PSA** - Antibióticos/antifúngico

**PS-COOH**: Nanopartículas de poliestireno carboxilados

**PS-NH<sub>2</sub>**- Nanopartículas de poliestireno aminadas

**PV**- Peso por volume

**PVC**- policloreto de vinil

**PS-NPs** – Nanopartícula de poliestireno

**PS-MNPs** – Micro e nanopartícula de poliestireno

**PEAD**- polietileno de alta densidade

**RE**- Recetor de estrogênio

**ROS**- Espécies reativas de oxigênio

**rpm** - Rotações por minuto

**SFB** - Soro fetal bovino

**SHIME**- Ecossistema microbiano do intestino humano

**SVHC**- Substância de grande preocupação

**TDI**- Ingestão diária tolerável

**TNF- $\alpha$** - Fatores de Necrose Tumoral Alfa

**$\mu$ g**- Micrograma

**$\mu$ L** - Microlitro

**UGTs**- Uridina difosfato glucuroniltransferases

**UI/mL**- Unidade Internacional por mililitro

**$\mu$ M** - Micromolar

**$\mu$ m**- Micrómetro

**USEPA**- Agência de Proteção Ambiental

**UV**- Radiação ultravioleta

# Introdução

## 1.1. Produção e libertação de plásticos para o ambiente

Nas últimas décadas, tem havido um aumento exponencial na produção e uso global de plásticos, resultando num aumento na libertação e acumulação de plásticos e substâncias utilizadas na sua produção no meio ambiente (Shi et al., 2021). Em mais detalhe, a produção passou de 1,5 milhões de toneladas em 1990 para 367 milhões de toneladas em 2020, sendo que na Europa foi gerada 17% da produção mundial de plásticos. Deste total, apenas 9% são reciclados e os restantes ficam acumulados em aterros sanitários ou dispersos pelos diversos ambientes (Campanale et al., 2020).

Atualmente, devido a acumulação de plásticos de diferentes tipos, formas, tamanhos em diferentes ambientes (água, solo, ar) (Campanale et al., 2020; Li et al., 2020; Prata et al., 2020), existe o alerta para a necessidade de verificar a segurança destes materiais. Há mais de uma década que os microplásticos (MPs, com tamanho < 5 mm) no meio aquático têm sido o foco de vários estudos, tendo mais recentemente surgido a preocupação com os riscos e segurança de MPs e nanoplásticos (NPs, com tamanho até 100 nm), para a saúde humana, após a deteção de MPs em ar, frutos do mar, mel, leite, cerveja, sal de mesa, saquetes de chá e café e inclusive em água potável (Cox et al., 2019).

Entre os diferentes tipos de plástico comercializados, o poliestireno (PS) é dos mais usados, representando 6.1% dos plásticos distribuídos na Europa em 2020, (*Plastics - the Facts*, 2021) e um dos mais comuns presente no ambiente, além de polipropileno (PP), polietileno (PE), polietileno tereftalato (PET) (Wang et al., 2021).

## 1.2- Libertação e Presença de Bisfenol A no ambiente

Os plásticos comumente utilizados contêm aditivos (monómeros ou oligómeros) utilizados para melhorar o desempenho dos polímeros (Campanale et al., 2020). No entanto, muitos deles são tóxicos uma vez libertados por diferentes mecanismos, durante seu uso ou descarte, incluindo a libertação, para ambientes como o ar, água e solo, acabando por atingir alimentos e tecidos humanos (Andrady & Neal, 2009; Fries et al., 2013). Entre os diferentes adjuvantes apresentam-se o Bisfenol A (BPA) (Campanale et al., 2020).

O BPA é um plastificante comum que é usado na indústria, usados em alguns recipientes de alimentos e bebidas (Pivonello et al., 2020) ou resinas e retardadores de chama, como também em tratamentos dentários (Vandenberg et al., 2007, 2010). Devido a sua extensa aplicabilidade e diversas vias e fontes de exposição, a par de diversos fatores, como a luz ultravioleta, calor, durabilidade de plástico e condições muito ácidas ou básicas que favorecem

a sua dispersão (Gajowik et al., 2013), existe uma preocupação quanto aos riscos do BPA na saúde humana (Vandenberg et al., 2007, 2010).

### **1.3- Vias de exposição oral**

Sabe-se que a via oral é uma das principais vias de exposição para MPs e NPs nos humanos. O sistema gastrointestinal (GI), por ter uma grande área superficial de ca. 200 m<sup>2</sup>, é considerado o primeiro local para absorção de NPs (van Pomeroy et al., 2017). Estes últimos podem superar a barreira GI e translocar-se para o tecido subjacente. Inclusivamente, alguns estudos *in vivo*, com animais aquáticos sugerem que NPs e MPs de tamanho (<5 µm) podem passar pela parede do trato gastrointestinal e ser bioacumulados (Roch et al., 2020), resultando em biomagnificação em cadeias tróficas, sugerindo prováveis exposições á humanos através de consumo de organismos marinhos (Lehner et al., 2019).

Estima-se que o consumo anual de MPs varia de 39-52 mil a 74-121 mil partículas, conforme a idade e sexo (Prata, 2018). Literatura adicional refere que a estimativa de consumo anual de MPs via oral foi calculada de 15 a 287g/pessoa (Senathirajah et al., 2021).

Em paralelo, estima-se que a exposição de BPA, por contaminação via dieta corresponde a 90%, principalmente através da ingestão de alimentos e água potável, armazenados em recipientes de plástico, ou por contaminação direta com os alimentos (Rudel et al., 2011). Além da ingestão oral, uma outra via de exposição do BPA é via dérmica através de papel térmico nas caixas registadoras, como também, através da via inalatória, principalmente em lugares com altas emissões de poeira ou em ambientes ocupacionais (Ribeiro et al., 2017; Yanagisawa et al., 2019).

### **1.4- Impacto das nanopartículas de poliestireno na saúde humana**

Dado a sua relevância, alguns estudos foram levados a cabo com PS em forma de NPs (Zhang et al., 2022). Devido ao seu tamanho pequeno, maior área de superfície específica e maior permeabilidade biológica (de Souza Machado et al., 2018), PS-NPs são capazes de atravessar diferentes barreiras biológicas, incluindo o epitélio GI, a barreira hematoencefálica e placenta (Florance et al., 2022; Hesler et al., 2019; Ragusa et al., 2021; Rubio et al., 2020). Num nível sub-celular, são capazes de penetrar facilmente em membranas de bicamadas lipídicas, atravessar a membrana celular, alterar a estrutura da membrana, reduzir a difusão molecular, induzir a destruição de organelos, interferir na homeostase celular provocando disfunção celular e lesão tecidual (Campanale et al., 2020; de Souza Machado et al., 2018).

Em paralelo, estudos de exposição *in vivo* de PS-MPs provocaram desequilíbrio intestinal (Liu et al., 2022) diminuição na produção de muco intestinal, alteração na função de barreira

intestinal, alteração no sistema metabólico (Jin et al., 2019), inflamação no intestino delgado e disbiose na flora microbiana no intestino nos ratos, (Li et al., 2020).

Portanto, tanto os estudos *in vitro* como os estudos *in vivos*, relevaram que a exposição a MPs e NPs através da via oral pode provocar alteração na proliferação e inflamação celular, havendo necessidade de entender o grau de gravidade na Saúde humana (Sangkham et al., 2022b).

Além disso, até ao presente, não existe uma estimativa da média de concentração ambiental de PS-NPs, portanto compreender os riscos dos PS-NPs na saúde humana é de extrema importância (Vecchiotti et al., 2021).

### **1.5- Impacto do Bisfenol A na saúde humana**

O sistema Gastrointestinal (GI), por ser a fonte primordial da exposição oral do BPA, é considerado, vulnerável a intoxicação do BPA, (Qu et al., 2018).

A maioria de estudos sobre os efeitos do BPA no sistema GI foi realizada em organismos aquáticos, existindo uma amostra pequena de estudos sobre o efeito de BPA em humanos. Vários estudos demonstraram o efeito de altas concentrações de BPA, sendo que o efeito de pequenas concentrações em diferentes órgãos ainda não está clara (Ismail & El-Meligy, 2022).

Sabe-se, que no sistema GI, a camada mucosa é a primeira a ser afetada após a exposição do BPA, provocando uma alteração na microflora intestinal. Há também registo de indução de stress oxidativo, indução da apoptose e destruição da função de barreira das células epiteliais intestinais (Javurek et al., 2016), resultante em inibição da secreção de mucina (Ola-Davies & Olukole, 2018). Além disso, o BPA também pode alterar a permeabilidade da barreira e provocar disfunção de células epiteliais intestinais (Braniste et al., 2010).

### **1.6- Importância de estudos com células gástricas e misturas químicas**

Foi demonstrado em modelos *in vivo*, que o no sistema GI dos peixes é a zona em que os MNPs são maioritariamente acumulados. Sendo a ingestão considerada a principal via de exposição para humanos dos NPs e BPA, as células gástricas são uma da rota de absorção preferida dos NPs. Além disso, estudo *in vivo* demonstrou que o estômago e os intestinos são os primeiros órgãos onde os MNPs podem ser absorvidos (Vecchiotti et al., 2021), portanto, estudos *in vitro* com linha celulares GI humanas são essenciais para fornecer informações sobre a toxicidade os MNPs e seu impacto na saúde humana.

A par disso, o número de estudos de misturas de substâncias tóxicas *in vitro* é ainda limitado, nomeadamente estudos de exposição combinada de NPs e plastificantes (Clérigo et al. 2022), tendo em conta o papel de MNPs como vetores de poluentes químicos e micro-organismos

(Blackburn 2022; Campanale et al. 2020; Sangkham et al. 2022). Portanto, avaliar os efeitos toxicológicos e os mecanismos subjacentes da exposição do PS-NPs e BPA, nas linhas celulares humanas, enfocando em sistemas de exposição combinadas é fundamental para a avaliar de risco dos NPs e plastificante na saúde humana (Abo-Elsoud et al., 2022), incluindo, a sua interação com células gástricas.

De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a toxicidade no sistema de exposição combinada de PS-NPs e BPA, na linha celular gástrica humana GP202 (RRID: CVCL\_S967), usamos uma abordagem que cobriu parâmetros de proliferação celular (citotoxicidade) e danos de DNA (genotoxicidade).

### **1.6- Questão de partida/investigação**

Segundo a bibliografia, vários estudos demonstram os efeitos de PS-NPs e BPA na proliferação e desregulação celular, assim como também, os efeitos citotóxicos e genotóxicos do BPA, desta forma foi delineada a seguinte pergunta de partida:

- Será que a exposição individual e combinada de PS-NPs e BPA provoca desregulação celular a nível da citotoxicidade celular e instabilidade genómica, na linha celular gástrica humana GP202?
- Será que a exposição combinada às maiores concentrações de PS-NPs e BPA irão ter maiores efeitos relativamente a viabilidade celular e a danos de DNA em comparação com a exposição individual?

### **1.7- Hipótese**

- A exposição individual a PS-NPs e a BPA em concentrações diferentes vai provocar desregulação celular a nível da viabilidade celular e instabilidade genómica na linha celular gástrica humana GP202;
- A exposição de PS-NPs nas concentrações mais elevada (200µg/mL) vai induzir alteração na citotoxicidade e genotoxicidade na linha celular gástrica humana GP202;
- A exposição de BPA, inclusivamente nas concentrações mais baixa (0,04ng/mL), vai provocar instabilidade genómica;
- A exposição combinada de PS-NPs e BPA nas concentrações mais elevadas vai potencializar os efeitos da proliferação celular a nível da viabilidade celular e danos no DNA.

## **2- Objetivos**

### **2.1- Objetivos gerais**

- Avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos da exposição individual e combinada de PS-NPs e BPA na linha celular gástrica humana GP202:
- Averiguar se a exposição combinada de PS-NPs e BPA nas maiores concentrações potencializa os efeitos citotóxico e genotóxicos, na linha celular gástrica humana GP202.
- 

### **2.3- Objetivos específicos**

Para as exposições individuais e combinadas de PS-NPs e BPA, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

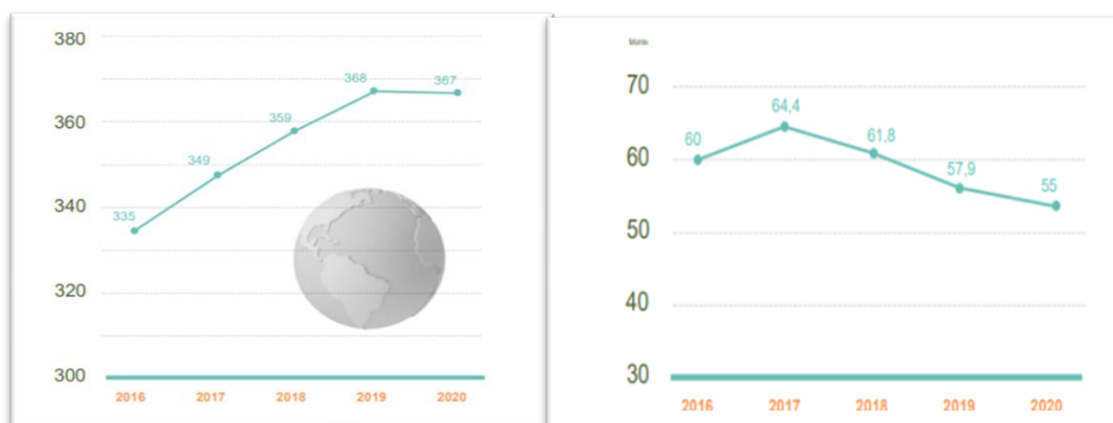
- Avaliar a citotoxicidade (viabilidade celular) na exposição individual nas concentrações de PS-NPs (200 µg/mL, 100µg/mL, 20µg/mL) e de BPA (1 ng/mL, 0,1 ng/mL e 0,04 ng/mL), e na exposição combinada nas concentrações de PS-NPs/BPA, (200 µg/mL/0,1 ng/mL e 200 µg/mL/0,04 ng/mL) e de BPA/PS-NPs (1 ng/mL /200 µg/mL/, 1 ng/mL/ 100 µg/mL/, 1 ng/mL/ 20 µg/mL), durante 24 horas.
- Avaliar a instabilidade genómica através do ensaio dos micronúcleos por bloqueio da citocinese nas exposições combinadas nas concentrações mais elevadas (200 µg/mL de PS-NPs + 1 ng/mL de BPA), durante 24 horas.

## 3- Enquadramento teórico

### 3.1- Plástico- Produção e libertação no meio ambiente

A palavra plástico vem da palavra grega *plastikós* devido, sua facilidade em moldar em diferentes formas. Plástico é um nome genérico e comum dado para designar material polimérico sintético e semissintético, derivado de petróleo, e que exhibe alta massa molecular e plasticidade (da Costa et al., 2016). O plástico é obtido, através dos processos de polimerização, ou seja, processos de síntese de longas cadeias de átomos de carbono, que dão origem a uma substância orgânica maleável a quente e resistente ao frio. Entretanto existem também plásticos que não são derivados do petróleo, como os plásticos derivados do amido, da celulose e de certas bactérias (da Costa, 2018).

A produção global dos polímeros plástico aumentou de forma exponencial, desde meados do século XX, de 1,5 milhão de toneladas em 1990 para 367,7 milhões de toneladas métricas em 2020 e espera-se o aumento de 33 bilhões de toneladas em 2050 (Yee et al., 2021). A China é um dos maiores produtores com 32 % e a Europa com 15 % correspondente a 55 milhões de toneladas (**Fig. 3.1**), sendo que, Portugal ocupa 2,1 % a nível europeu. Os plásticos devido a produção barata e características químicas favoráveis, como leveza e estrutura forte, a produção de embalagem plástica na Europa corresponde a 40,5%, 20,4% é usado na construção e edificações e 8,8% na indústria de móveis, segundo site de Plastics Europe (*Plastics - the Facts*, 2021). Contudo, apenas umas pequenas quantidades de resíduos de embalagens plásticas são colhidas e usada para reciclagem, recuperação de energia ou aterro, os restantes são libertados para o ambiente natural, resultante na poluição global. Em 2020, foram colhidos cerca de 29 milhões de toneladas de resíduos plásticos pós-consumo, sendo que 34% foi enviada para reciclagem, 23,4% para os aterros e mais de 42% foi enviado para operações de valorização energética (*Plastics - the Facts*, 2021). Portanto, é notável que os números de coleta de resíduos plásticos pós-consumo são muito menores relativamente aos números de demanda ou consumo de plástico. Além disso, os produtos de plástico têm uma vida útil alongada. Dependendo do tipo de polímero, a sua degradação pode variar de 1 a 50 anos, dada a sua resistência á biodegradação e fatores ambientais, tais como, radiação UV, mudanças termodinâmicas, vento, as águas do mar (Kik et al., 2020).



**Figura 3.1:** Produção de plástico: A: Produção mundial de plástico. B: Produção de plástico na Europa. **Fonte:**(Plastics - the Facts, 2021).

### 3.2- Classificação de partículas plásticas

Os polímeros plásticos devido aos fatores biológicos, físicos e químicos e com base no tamanho, estrutura química, degradam lentamente em fragmentos menores tais como; macroplásticos (MAPs), mesoplásticos (MSPs), microplásticos (MPs) e nanoplásticos (NPs) (**Tabela 3.1**) (Wu et al., 2019). MAPs são objetos cuja uma das dimensões é superior a 25 mm, MSPs são objetos com dimensões entre 5–25 mm, MPs são partículas de plástico com diâmetro inferior a 5 mm (Lehner et al., 2019), enquanto NPs foi definida por (Gigault et al., 2018) tendo a maior das suas dimensões inferior a 1000 nm, contudo recentemente foi definida pelo comitê científico dos riscos a saúde, como uma partícula com uma dimensão de 1 a 100 nm de tamanho (EFSA,2016).

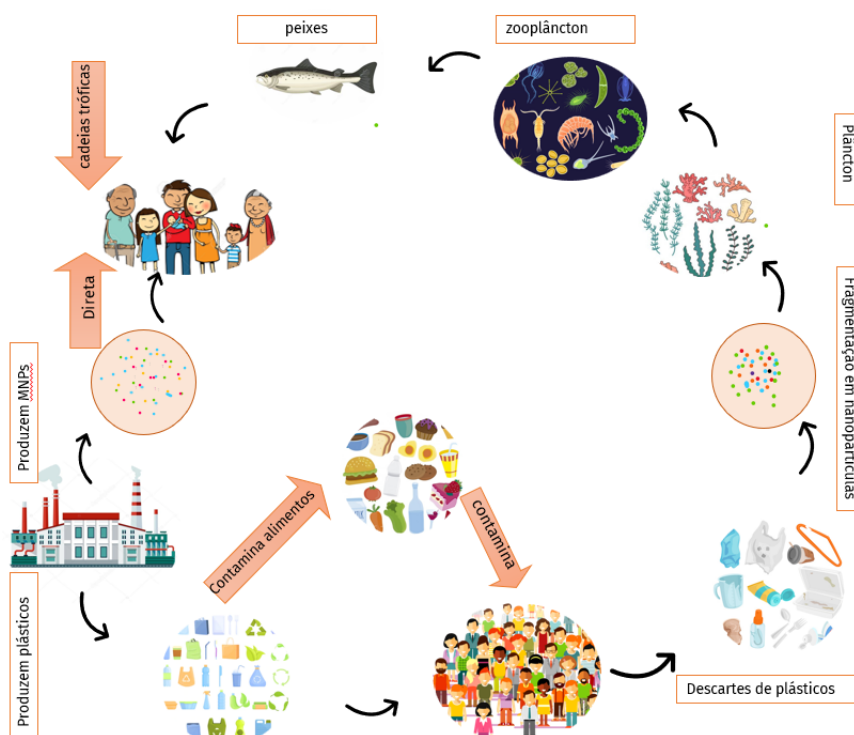
Os MPs e NPs dependo da sua fonte são classificados como primários e secundários. Os MNPs primários, incluindo as partículas de PS, são aquelas que são produzidos proposadamente com formas e tamanhos específicos (Anderson et al., 2016; Blackburn, 2022), são amplamente usados em produtos cosméticos (produtos de limpeza facial, agentes esfoliantes para lavagem das mãos e fórmulas de peeling) (Andrady, 2011), fábricas produtoras de embalagens plásticas (De Falco et al., 2018), dispositivos médicos e eletrônicos, medicamentos, diagnósticos, tintas, (Efimova et al., 2018). Além disso os NPs são amplamente utilizados na indústria cosmética, e são liberados em processos de engenharia de alta temperatura (Snopczyński et al., 2009). Enquanto os MNPs secundárias são partículas plásticas resultantes da decomposição processos físicos e químicos (da luz ultravioleta, oxidação, desgaste mecânico, vento, onda (Jin et al., 2018). Segundo a literatura, a grande maioria da poluição plástica, deriva de fontes secundárias, especialmente a partir de fibras sintéticas e liberadas como resultado do manejo inadequado de resíduos plásticos,

como também através da indústria de embalagem, uso excessivo e má gestão de descartes dos produtos plásticos, (Kik et al., 2020). Portanto tanto as fontes primárias como secundárias, gera um ciclo de poluição plástica, conforme mostra a **Fig. 3.2** (Yee et al., 2021).

**Tabela 3.1:** Classificação dos detritos plásticos com base em seu tamanho e forma. **Fonte:** Adaptação (Sangkham et al. 2022; EFSA,2016 ).

Classificação	Diâmetro	Formas
<b>Nanopartículas (NPs)</b>	1 – 100 nm	Fragmentos, grânulos, nurdles, microesferas, esferas esféricas, esferas irregulares, grânulos, espuma, fibras, filme e fragmentos comerciais (aparência de plástico)
<b>Micropartículas (MPs)</b>	1 - 5 mm	
<b>Mesopartículas (MSPs)</b>	5 - 25 mm	
<b>Macropartículas (MAPs)</b>	> 25 mm	

Relativamente aos NPs, existe ainda a probabilidade de haver uma sub-estimação da sua quantificação e o seu impacto, dado que existem ainda limitações das técnicas usadas para quantificação de partículas deste tamanho (Wang et al., 2021). Por exemplo através de espectroscopia de infravermelhos transformada de Fourier (FTIR) apenas se consegue detetar partículas como tamanho igual ou superior a 3 µm (Jenner et al., 2022) enquanto que por microscopia eletrónica, apenas se consegue detetar partículas com aproximadamente 50 µm (Shi et al., 2021).




**Figura 3.2:** Fonte e destino de Micro e nanopartículas primária e secundária no meio ambiente. **Fonte:** Adaptação (Yee et al., 2021).

### 3.3- Características e tipos de plástico

Tendo em conta as características física, os polímeros plásticos são agrupados em dois grupos: os termoplásticos e termofixos (Reddy et al., 2015). Os termoplásticos, dependem da temperatura para serem deformadas, são mais reversíveis, versáteis, podem ter qualquer forma e podem ser fundidos várias vezes. Enquanto termofixos as suas modificações são permanentes (Hurley et al., 2015; Reddy et al., 2015). A resina plástica incluindo polietileno (PE), polipropileno (PP), policloreto de vinil (PVC), polietileno tereftalato (PET), poliestireno (PS) e o politetrafluoretileno (PFTE) são exemplos de termoplástico (Reddy et al., 2015).

Relativamente às estruturas químicas dos polímeros plásticos, podem ter espinha dorsal carbono-carbono (PE, PP, PS e PVC) ou sintéticos (incluindo PE, PS, PP, PET, PVC e PTFE) ou pode tem uma espinha dorsal carbono-oxigênio, como é o caso de PET (Singh & Sharma, 2008). Portanto, dependendo da sua estrutura química, nomeadamente, a capacidade do formar ligações covalentes, isto é, a capacidade do carbono em compartilhar quatro elétrons com outros átomos (Gewert et al., 2015). O PE é caraterizado por apresentar uma longa cadeia de ligação de moléculas de carbono – hidrogênio, além disso é considerado o mais simples do grupo metil (Wypych, Handbook of Polymers, 2012). Enquanto o PP, PS e PVC possuem um grupo funcional em todas as outras moléculas de carbono da cadeia da espinha dorsal, comparadas ao PE. Relativamente ao PTFE, possui uma cadeia carbônica, com ligações covalente com o flúor. O PS devido a adição de um anel benzénico (aromático) é fenil, o PVC é clorado, o PP é metil (Wypych, Handbook of Polymers, 2012), conforme ilustra a **Fig. 3.3**.

Entretanto, existem mais de 45 tipos de plásticos comercializados, todavia os mais utilizados são os polímeros sintéticos: PS, polietileno de baixa densidade (PEBD), polietileno de alta densidade (PEAD), PP, PVC e PET (J. Li et al., 2016).

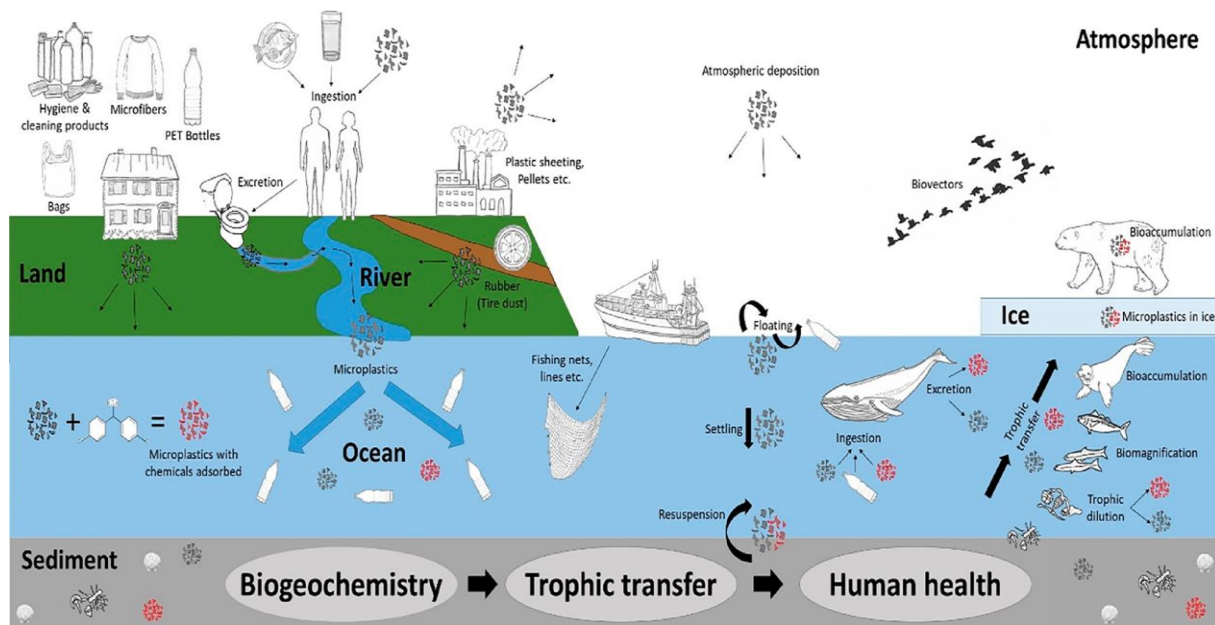
Polímeros	Estrutura	Modificações	Espinha dorsal	Figura3.3: Estrutura, modificação e características da espinha dorsal de resinas comuns: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), politetrafluoretileno (PTFE), policloreto de vinil (PVC), politereftalato de etileno. (PET). Fonte: Adaptação (Schröter & Ventura, 2022).
Polietileno (PE)	$\left[ \text{CH}_2 \right]_n$	-	Carbono-carbono	
Polipropileno (PP)	$\left[ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$	Misturado	Carbono-carbono	
Poliestireno (PS)	$\left[ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH} \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_n$	Fenil	Carbono-carbono	
Politetrafluoretileno (PTFE)	$\left[ \text{CF}_2\text{CF}_2 \right]_n$	Fluor	Carbono-carbono	
Policloreto de vinil (PVC)	$\left[ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH} \\   \\ \text{Cl} \end{array} \right]_n$	Cloro	Carbono-carbono	
politereftalato de etileno (PET)		Fenil	Carbono-oxigênio	

### 3.4- Plastificantes

Os polímeros plásticos, descartados nos aterros sanitários e nos ambientes naturais são compostos por dois tipos de produtos químicos, os aditivos e matérias-primas poliméricas, que são produtos químicos adicionados propositalmente durante o fabrico para melhorar as qualidades de plásticos (Campanale et al., 2020), incluindo os plastificantes, cargas inertes ou de reforço, antioxidantes, estabilizadores de UV, lubrificantes, corante e retardador de chamas (Hahladakis et al., 2018). O grande problema é que muitos deles são considerados tóxicos, para a saúde humana (Andrady & Neal, 2009; Fries et al., 2013), um dos aditivos que são usados diariamente para dar qualidade ao plástico é o Bisfenol A (BPA) (Campanale et al., 2020).

### 3.5- Rotas de plásticos no ambiente

O aumento exponencial da produção e uso, a baixa eficácia no tratamento e alta resistência de partículas plásticas, resulta numa poluição global de plástico (Prata et al., 2020). Este encontra-se presente em diferentes formas, polímeros, tamanhos e concentrações e em diferentes ambientes, aquático, terrestre (Rillig et al., 2017) e na atmosfera (Prata, 2018), resultante na bioacumulação nos alimentos e nos organismos (Rezania et al., 2018). Bank & Hansson, sugerem que a poluição plástica, tal como a poluição por carbono segue um ciclo biogeoquímico (ciclo plástico). Em mais detalhe, as partículas plásticas podem ser transportados da terra para o oceano, do oceano para atmosfera, da atmosfera para a terra, estando depositados na terra são transportados para os lagos e rios, que os leva de volta ao oceano formando o ciclo de plástico (**Fig. 3.4**) (Bank & Hansson, 2019). Além disso, os MNPs acumulados nos oceanos por serem tão pequenas, podem ser transportados para a atmosfera, estando nas nuvens passam pelo processo de precipitação conseguem ser transportadas para vários ambientes naturais incluindo oceanos, ambientes terrestre remotos (Bank & Hansson, 2019; Rochman, 2018). Estima-se que a cada ano, são transportados 1,21 tonelada de MPs atmosféricos em suspensão proveniente da terra para o ambiente marinho (K. Liu et al., 2019). Estudos anteriores relataram que os MPs atmosféricos podem atingir a uma distância de até 95 km (Allen et al., 2020). Um estudo feito em França (Paris), relatou que encontrou 29–280 partículas m<sup>2</sup>/ dia de MPs em precipitação atmosférica (Dris et al., 2015).



**Figura 3.4:** Ciclo de plástico, **Fonte:** (Bank & Hansson, 2019; Rochman, 2018).

### 3.6- Exposição de humanos a plásticos

Uma das principais fontes de exposição dos MPs e NPs é através das microfibras têxteis, assim como também os escapes de automóveis (pneus e motores) e Incêndios florestais (Nusair et al., 2019). Um estudo, feito nos MPs atmosféricos suspensos detetaram 4,18 m<sup>3</sup> itens de MPs (K. Liu, Wang, et al., 2019), sendo que a maioria eram microfibras. Além disso, estimularam uma inalação de cerca de 21 partículas MPs por dia ao ar livre em Xangai na China (K. Liu, Wang, et al., 2019). Um estudo analisou os tipos de MPs presentes na precipitação atmosférica na cidade de Dongguan, relatou que a maioria dos MPs encontrados eram fibras (Cai et al., 2017). Assim como também, outro estudo notou que 60% de MPs suspensas no ar marinho no Oceano Pacífico Ocidental eram microfibras (K. Liu et al., 2019). Devido ao seu tamanho pequeno, os PS-MNPs atmosférico, podem ser inalados diretamente, e dada a sua capacidade de atravessar barreiras biológicas, podem se bioacumularem nas vias respiratórias resultante nos efeitos no sistema respiratório e consequentemente na saúde humana. Sabe-se, que o tamanho de PS-NPs, incluindo a concentração de exposição e duração da exposição, são fatores chaves que favorecem a sua toxicidade através da via inalatória (M. Xu et al., 2019). Além disso, estudos anteriores relataram que a exposição de PS-MNPs através de via inalatória, induziu, alteração na viabilidade celular, respostas inflamatórias, resultante em efeitos citotóxicos e genotóxicos (Dong et al., 2020; Paget et al., 2015). Paralelo a esses estudos, Shi et al, demonstrou que a exposição individual e combinada de PS-NPs e PAEs, nas células epiteliais pulmonar humanas A549 provocou alterações na viabilidade celular, estresse oxidativo e reação inflamatória (Shi et al., 2021).

A par com a exposição por inalação, outra principal fonte de MNPs será através da dieta. Até hoje, foi verificada a bioacumulação de MPs nas ostras, detetando MPs em todos os tecidos da ostra (Zhu et al., 2020). Assim como também, outro estudo relatou efeitos imunotóxicos devido a exposição de MPs e POPs (Tang et al., 2020). Desse modo, não se pode negligenciar o possível risco que as partículas plásticas representam para a saúde humana, caso esses contaminantes fossem ingeridos (Zhu et al., 2020).

Um estudo sobre a acumulação tecidual de poliestireno em peixe-zebra detetou MPs de 5 µm de diâmetro nas brânquias, fígado e intestino e MPs menor que 20 µm de diâmetro apenas nas brânquias e no intestino e relataram que a exposição a MPs provocou inflamação, alterações nos perfis metabólicos no fígado e distúrbios no metabolismo lipídico e energético (Y. Lu et al., 2016). Em outro estudo com peixe-zebra foi relatado que houve acumulação de MPs no intestino e foram observados danos na mucosa, aumento da permeabilidade, inflamação, alteração do metabolismo e disbiose intestinal, após a exposição a três formatos de MPs, incluindo em formas de fibras, (Qiao et al., 2019). Semelhante a estudos anteriores, Pannetier, et al., fez a exposição de MPs simulando a contaminação trófica, em concentrações ambientais em Larvas e juvenis de peixes *Medaka*, durante 30 dias, demonstraram que houve redução no crescimento, redução de locomoção, aumento da mortalidade, alterações nas características físicas das lavas, nomeadamente diminuição da proporção cabeça/corpo e alterações no DNA, sugerindo que MPs podem provocar efeitos tóxicos em concentrações ambientais (Pannetier et al., 2020).

Devido a ubiquidade de MPs, em vários ambientes, atualmente tem havido um aumento crescente de estudos que detetam as partículas de plásticos nos alimentos, (Grote et al., 2023). Os MPs já foram detetados em vários alimentos de uso diário, incluindo foi encontrado concentrações médias de 1,48/g de MPs em frutos do mar, 0,44/g em açúcar, 0,10/g mel, 0,11/g em sal, 32,27/L em álcool, 94,37 /L em água engarrafada e 4,23/L em água da torneira (Cox et al., 2019). E recentemente foi encontrado MPs de 2 a 12 µm no leite materno (Ragusa et al., 2022).

### **3.7- Poliestireno**

O poliestireno (PS) é um dos variados tipos de plásticos comercializados, para além de, PP, PE, PET, é um dos mais comuns presente no ambiente e representa 6.1% dos plásticos distribuídos na Europa (*Plastics - the Facts*, 2021) (Wang et al., 2021).

PS é um polímero aromático resultante da desidrogenação catalítica do etilbenzeno que leva à formação de monômeros de estireno (Wusch, 2000). O estireno (vinilbenzeno) por sua vez é produzido a partir de etileno e benzeno (etilenobenzeno) (Kik et al., 2020).

É caracterizado por um polímero termoplástico, devido as suas propriedades físicas-químicas como sua leveza, rigidez, isolamento térmico e acústico, alta translucidez, durabilidade, pode ser facilmente processada. É utilizadas em inúmeras áreas de aplicação em uma ampla gama de indústrias inclusive na produção de embalagens de alimentos (laticínios, pesca), recipientes de alimentos (como bandejas, pratos, copos), na produção de brinquedos, isolamento de edifícios, equipamentos elétricos e eletrônicos, escovas de dentes, cliques e material de escritório, forro interno para geladeiras, armações de óculos (Wusch, 2000) (Domininghaus, 1992) . Contudo, segundo a agência federal do departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos- FDA, a ingestão diária admissível (DDA) de estireno deve ser 90.000/p/ dia microgramas por pessoa por dia (Kik et al., 2020).

Atualmente uma das principais tendências no mercado de PS é o uso de poliestireno expandido (EPS) reciclado, resultante do descarte do mesmo, (Mordor intelligent, 2022).

### **3.7.1. Classificação Toxicológica do poliestireno**

Atualmente, devido a uso de PS, em vários tipos de aplicações e processamentos nos diferentes setores, existem várias agências internacionais que fazem a supervisão quanto a sua segurança e a toxicidade, na saúde, particularmente quanto ao risco da libertação de monômeros de estireno no meio ambiente durante processos de fusão ou polimerização (Gurman et al., 1987).

No entanto, não existem estudos que indiquem um potencial carcinogênico das PS-NPs. Por outro lado, a Agência Internacional de Pesquisa de Cancro (IARC), classificou o monômero PS – o estireno e o os metabolitos de estireno, como substâncias potencialmente carcinogênicas da classe de carcinogenicidade B2 e provavelmente carcinogênico para os seres humanos grupo 2A respetivamente (Kik et al., 2020).

De acordo com a FDA, a ingestão diária admissível (DDA) de estireno estimada, é de 90.000 µg/pessoa/dia (FDA, 2002). A Agência de Proteção Ambiental (EPA), relatou que a exposição crônica de estireno não pode ultrapassar a 300 ppm (1000 µg/m<sup>3</sup>) (Mutti et al., 1992). e a sua utilização na indústria não passar acima de 20 ppm ((WHO), 2000). Entretanto, segundo a literatura, a estimativa diária da exposição de estireno de PS é de e 9 µg/pessoa/dia (Lickly et al., 1995). Além disso, consideram que existe uma baixa toxicidade, relativamente a quantidades de produtos resultante da degradação de uma embalagem de PS (estireno) (Gurman et al., 1987).

### **3.7.2. Efeito de PS-NPs na saúde humana e sistema gastrointestinal**

Devido as limitações das técnicas, falta de metodologias robustas e confiáveis que permitam a sua extração, detecção, quantificação e caracterização poucas informações estão

disponíveis sobre os efeitos de PS- NPs no meio ambiente e organismos vivos (Wahl et al., 2021). Sabe-se que os NPs possuem maior superfície de reatividade, são mais facilmente absorvidos do que os MPs (Richards & Endres, 2017), resultante em maior predisposição em absorver outros contaminantes tóxicos ambientais (Pathan et al., 2020).

Relativamente a saúde humana, não existem dados disponíveis que evidência os efeitos tóxicos de PS-MNPs (Blackburn, 2022; Sangkham et al., 2022) (**Fig. 3.5**), embora, se especule que a ingestão de MP/NPs possam ser um risco para a saúde humana (Verla et al., 2019). Estudos em modelos *in vivo* e *in vitro* (Blackburn, 2022; Sangkham et al., 2022) sobre os efeitos dos Ps-NPs e seus plastificantes suportam com evidência. Sabe-se que a via oral é uma das principais vias de exposição por PS-NPs, e seus aditivos, através de alimentos e bebidas contaminados, como também através de creme dental, produtos médicos utilizados por dentistas, como também através de encapsulamento de medicamentos incluindo sistemas de entregas de fármacos baseados em partículas (Cox et al., 2019; Elkalla et al., 2023).

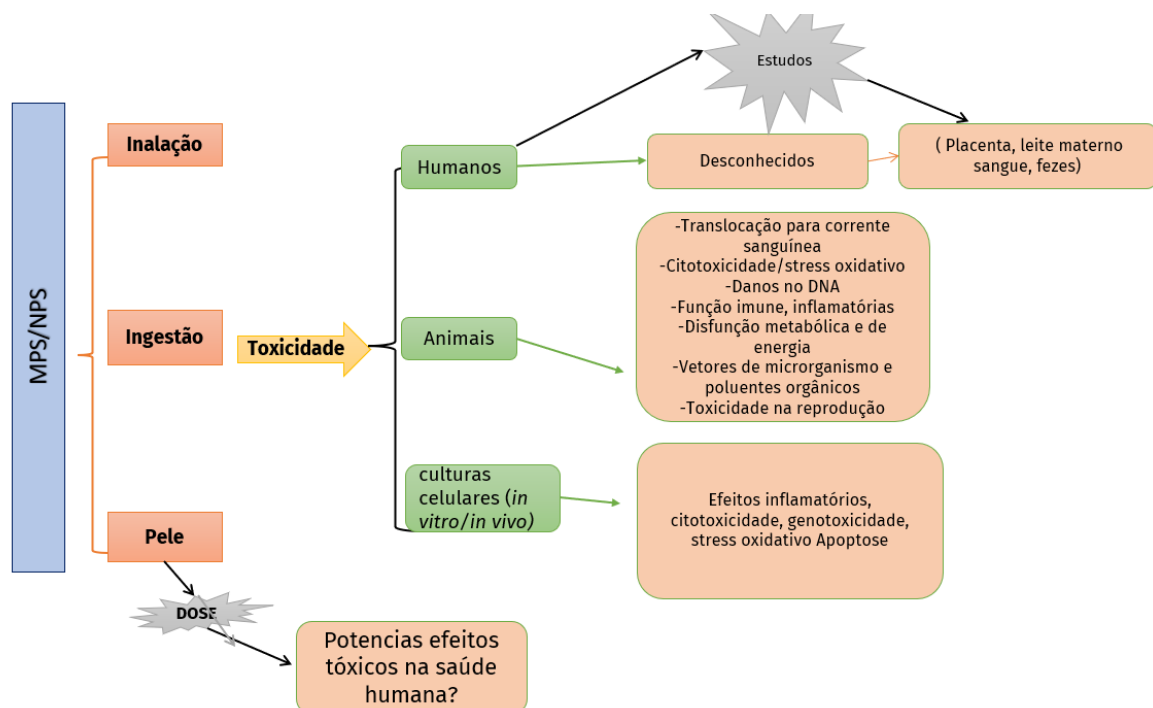
Segundo a literatura, os efeitos da toxicidade dos MNPs depende do tamanho, forma, composição química, carga superficial, hidrofobicidade, do ambiente e do próprio organismo afetado. Sabe-se que partículas menores, incluído os PS-NPs, são mais facilmente internalizadas, resultante em maior toxicidade do que partículas MPs (Banerjee & Shelver, 2021). Em conformidade, com esses achados, um estudo investigou a exposição de PS-NPs 40 e 100 nm de tamanho, nas células epiteliais de adenocarcinoma gástrico humano, observaram que PS-NPs de menor tamanho (40 nm), induziu a diminuição da viabilidade celular e expressão gênica da respostas inflamatória (Forte et al., 2016).

A exposição de PS-NPs de 40 nm de tamanho nas células epiteliais pulmonares humanas, provocou diminuição da viabilidade celular, indução da apoptose, alteração da expressão gênica e da função da barreira epitelial alveolar (S. Yang et al., 2021). Além disso, Xu et al., analisou a exposição crônica de 10 mg/mL, de PS-NPs (100 nm), através da via oral, relatou que houve indução de apoptose celular, inflamação e distúrbios estruturais, associado a bioacumulação de PS-NPs, nos ratos. (Xu et al., 2021).

Portanto, os PS-NPs, estando internalizada, quer por vias oral, inalatória ou dérmica, são capazes de atravessar barreiras biológicas, como membranas celulares, incluindo barreiras GI, a barreira hematoencefálica e placenta (Florance et al., 2022; Hesler et al., 2019; Ragusa et al., 2021; Rubio et al., 2020). A nível sub-celular, são capazes de penetrar facilmente em membranas de bicamadas lipídicas, atravessar a membrana celular, alterar a estrutura da membrana, reduzir a difusão molecular, induzir a destruição de organelos, interferir na homeostase celular resultante na alteração da função celulares e lesão tecidual (Campanale

et al., 2020; de Souza Machado et al., 2018). Portanto o efeito dos PS-NPs é sistêmico, desencadeado através do sistema GI, respiratório, imunológico (Grote et al., 2023).

Tanto nos estudos *in vitro* como *in vivo*, relataram que a exposição PS-MNPs, induziram efeitos tóxicos nas células, tecidos e organismo, nomeadamente alteração na viabilidade celular, estresse oxidativo, diminuição da resposta imune, inflamação, citotoxicidade, dano no DNA, alteração metabólica, alteração na reprodução, efeitos neurotóxicos e induzem respostas imunes á carcinogénese em animais e células humanas (Fig. 3.5) (Kumar et al., 2022; Sangkham et al., 2022). Contudo, estudos sobre os efeitos da exposição combinada de MNPs e plastificantes no sistema GI, são insuficientes.



**Figura 3.5:** Efeitos de PS-MPs e SP-NPs no organismo. **Fonte:** Adaptação (Sangkham et al., 2022).

Estima-se que 90% da exposição por MNPs é por via oral (van Pomeran et al., 2017), através de ingestão de alimentos contaminação (cadeia trófica e alimentos contaminados), bebidas (água, engarrafada e da torneira, cervejas) e produtos de higiene pessoal (creme dental), produtos médicos (implantes ortopédicos cirúrgicos, implantes dentários) (Cox et al., 2019; Elkalla et al., 2023). Portanto o sistema GI é uma das principais vias de exposição de MNP e sendo o estômago e o intestino os primeiros órgãos onde se dá a absorção de MNPs (Vecchiotti et al., 2021), portanto, estudos *in vitro* com linha celular GI humanas são plausíveis para testar os efeitos de MNPs na saúde humana.

Segundo a literatura, a exposição de MNPs no sistema GI induziu diminuição na produção de muco intestinal, alteração metabólicas (Jin et al., 2019; Lu et al., 2018) alteração no intestino delgado (B. Li et al., 2020) desequilíbrio imunológico intestinal, resultante na falha da barreira intestinal e disbiose microbiana no intestino nos modelos *in vivo*. (Liu et al., 2022). A nível sub-celular esses processos de redução, desencadeia diferentes mecanismos de ação, como libertação de diferentes radicais livres, especificamente espécies reativas de oxigênio (ROS) (X. H. Zhang et al., 2011). Sabe-se que a produção excessiva de ROS pode desencadear estresse oxidativo que pode levar à desregulação da expressão gênica, incluindo Fatores de Necrose Tumoral Alfa, Interleucina Beta e Interferão-gama (TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , e IFN- $\gamma$ ) (Liu et al., 2022) diferentes estados redox celulares e danos ao DNA e nas proteínas (**Fig. 3.6**). Além disso, especula-se que os mecanismos de ação sub-celular desencadeados pela exposição de MNPs, são parecidos com os processo carcinogénese (Nickens et al., 2010; Vecchiotti et al., 2021).

Além disso, existem estudos *in vitro* em que se investigaram os efeitos de PS-NPs. Inkielewicz-Stepniak et al., investigou a exposição de PS-NPs modificados e não modificado, nas concentrações de (20, 50, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em 3 linhas celulares epiteliais intestinais humanas (LS174T, HT-29 e Caco-2), observando indução na alterações na viabilidade celular, indução de apoptose e relatou que os PS-NPs não modificados e carboxilados (PS-COOH) tiveram menor alteração em comparando com os PS-NPs aminadas (PS-NH<sub>2</sub>) (Inkielewicz-Stepniak et al., 2018). Outro estudo avaliou a exposição de PS-NPs (40 e 100 nm de tamanho), nas células epiteliais de adenocarcinoma gástricos humanas relatando alteração na viabilidade celular, alteração na expressão de genes inflamatórios interleucina 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e na morfologia celular (Forte et al., 2016).

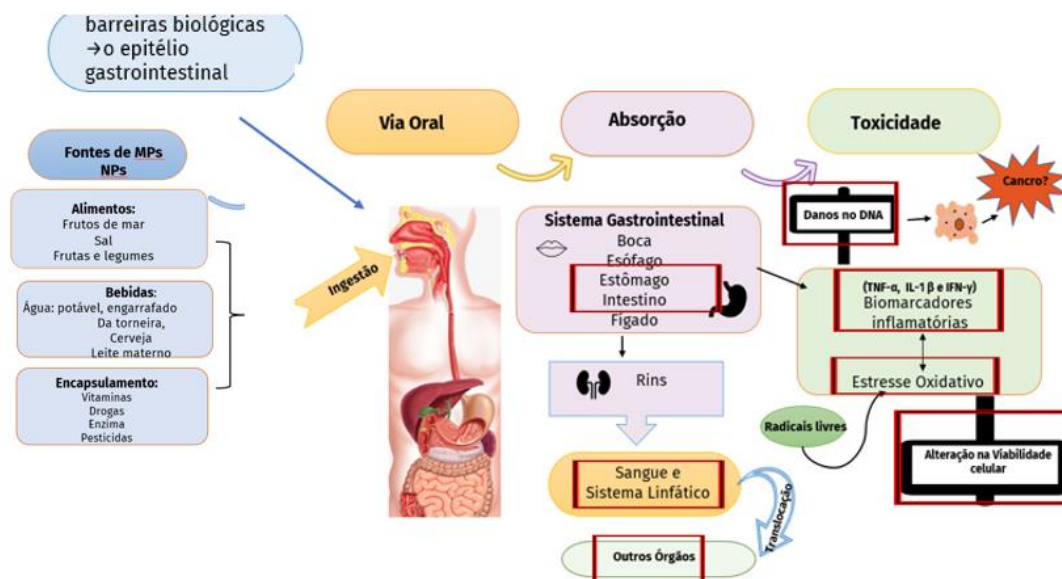
Em corroboração com os resultados anteriores, Wu, et al., avaliou a exposição de PS-NPs (0,1  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ ) na linha celular Caco-2 de adenocarcinoma de cólon humano, relatando que se observaram efeitos significativos na viabilidade celular, enquanto a exposição de PS-NPs (0,1  $\mu\text{m}$ ) nas concentrações maior ou igual a 20  $\mu\text{g/mL}$  e PS-MPs (5  $\mu\text{m}$ ) nas concentrações maior ou igual a 80  $\mu\text{g/mL}$  provocaram danos na membrana mitocondrial, inibição da atividade do transportador de ATP na membrana plasmática, e a exposição combinada de PS-NPs com arsénio provocou um aumento da toxicidade do arsénio (Wu et al., 2019).

Estudos com modelos de cultura tripla e monoculturas em três linhas celulares (Caco-2/HT29, MTX-E12 e THP-1), investigaram os efeitos genotóxicos da exposição PS-NPs (tamanho 50 nm) e PVC (<50  $\mu\text{m}$ ), em intestinos humanos saudáveis e inflamados, durante 4 h. Não foram observados efeitos genotóxicos no intestino saudável, enquanto que a exposição de partículas de PVC na concentração de 50  $\mu\text{g cm}^{-2}$  induziu libertação de IL-1 $\beta$  e provocou a perda de

células epiteliais e dano ao DNA no intestino com processos inflamatórios ativos (Busch et al., 2021).

Para avaliar a exposição crônica no sistema GI, outro estudo *in vitro* investigou as possíveis alterações da exposição PS-NPs de 50 nm, nas concentrações sub-tóxicas e imitando exposição oral de 7 µg de equivalente ao consumo de 225 g de mexilhões (0,0006, 0,26, 1,3 e 6,5 µg/cm), na linha celular Caco-2, durante 8 semanas. Como resultado, 20% das células, tiveram a bioacumulação de PS-NPs e alteração de expressão gênica, incluindo relacionados ao estresse oxidativo, mas não teve nenhum efeito associado ao dano no DNA (Domenech et al., 2021).

Portanto, tanto nos estudos *in vitro* como *in vivo*, relataram toxicidade, relativamente aos efeitos na citotoxicidade e genotoxicidade no GI, além disso, a maioria dos resultados houve concordância, quanto a translocação de partículas de MNPs da barreira intestinal através do sistema circulatório para outros órgãos, como também, a inflamação celular resultante da exposição de MNPs no GI (Sangkham et al., 2022). No entanto, informação sobre os efeitos de MPs e NPs na saúde humana continua limitada (Sangkham et al., 2022), portanto estudos com linhas celulares são imprescindíveis.



**Figura 3.6:** Via de exposição MNPs oral e seus potenciais efeitos tóxicos no sistema gastrointestinal. **Fonte:** Adaptação (Sangkham et al., 2022).

### 3.8. Bisfenol A

O Bisfenol A (4,4'-isopropylidenediphenol- BPA) é um sólido cristalino, incolor, pertence a família dos compostos orgânicos. A sua fórmula química é  $C_{15}H_{16}O_2$ , é um composto orgânico formado pela união dois grupos fenóis, com uma acetona (**Fig. 3.7**) (Coupar et al., 1997). É predominante usado como monômero sintético, utilizado amplamente na produção

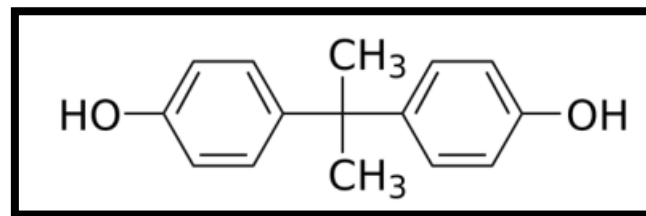
de plásticos de policarbonato (70%) e resina epóxi, mas também é utilizado na produção de polissulfona ou poliacrilato (Vandenberg et al., 2009), (Geens et al., 2011). Estima-se que a nível global são produzidos três milhões de toneladas de BPA por ano (Erler & Novak, 2010). Além disso prevê-se um aumento maior que 6% de taxa de crescimento anual composta de BPA (CAGR), nos próximos 5 anos (de 2022 a 2027), sendo que a região Ásia-Pacífico apresenta a maior taxa de crescimento no mercado de BPA. É considerado uma substância onnipresente encontrada em quase todos os tipos de ambiente na água, solo, ar, lodo de esgoto (Rubin, 2011). Estima-se que a concentração do BPA em solos europeus de cerca de 140 µg/kg de peso seco (pd) (Kwak et al., 2018). Um estudo em Egito (Alexandria) detetou BPA na água potável nas concentrações de 2230 ng/L de BPA (Bi et al., 2010; Radwan et al., 2020). E na China detetaram uma média de  $1.1 \times 10^6$  pg/m<sup>3</sup> de BPA no ar (Gao et al., 2023). É utilizado para uma grande variedade de produtos de consumo, incluindo para revestir a parte internas das latas, de recipientes de bebidas e tampas de garrafas, produtos cosméticos, brinquedos, materiais odontológicos (selantes dental), equipamentos médicos (máquinas de coração-pulmão, incubadora, maquinas de hemodialise), agente de revelação de cores em papel térmico, incluindo, recibos de caixa registradora, cartão de crédito, bilhetes de transporte público e estacionamento, etiquetas autoadesivas, recibos térmicos, na construção civil, incluindo tubos de canalização de água, eletrodomésticos (Klemeš et al., 2020; Kyrila et al., 2021; Vandenberg et al., 2007). Também é utilizado na produção de plastificantes, retardador de chama, antioxidantes, pesticidas (Huang et al., 2012).

Sabe-se que a exposição ao BPA ocorre sob condições em que o monómero residual no polímero é libertado para os alimentos e bebidas, ou onde o próprio polímero se hidrolisa, libertando assim o BPA (Preethi et al., 2014). Além disso, no processo de esterilização dos enlatados, estima-se que 80% a 100% do total de concentrado de BPA nos enlatados, passa para os alimentos (Goodson et al., 2004). Portanto acredita-se que o BPA pode passar dos enlatados para alimentos, dos selantes dentária para a saliva, de garrafas plásticas para água (Noureddine El Moussawi et al., 2018; Vandenberg et al., 2007).

Estima-se, que 90% da exposição geral do BPA, é através dos alimentos, portanto a via oral é considerada uma das principais vias de contaminação do BPA nos humanos (Christensen et al., 2012; Rudel et al., 2011).

Um estudo avaliou a exposição global de BPA, em 30 países, incluindo 6 países de união Europeia (EU), estimou uma ingestão diária global de 30,76 ng/kg pc/dia para adultos e 60,08 ng/kg pc/dia para crianças (R. ping Huang et al., 2017). Recentemente, um outro estudo usou modelo farmacocinético de base fisiológica para calcular a exposição diária do BPA total em crianças em diferentes países da Europa, estimou o uso diário medio de 0.0723 µg/kg Pc/dia

(Deepika et al., 2022). Além disso relataram que que a exposição de crianças ao BPA é 1500 vezes maior que a recente a ingestão diária tolerável (TDI) proposta pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), de 0,04 nanogramas (ng) por quilograma de peso corporal (PC) (Deepika et al., 2022). Além disso, segundo um estudo feito com alimentos do supermercado nos EUA (Texas), foi detetado BPA nas concentrações de 0,24 ng/g p.c. em pêssego fresco, a 149,0 ng/g P.C em feijão verde enlatado, 121,0 ng/g P.C em milho enlatado e 80,6 ng/g P.C. em vegetais mistos enlatados e 0,41 0 ng/g P.C no sumo de frutas (Lorber et al., 2015). Recentemente, alguns países de Europa, incluindo Portugal, foi detetado BPA em carne enlatada (enchidos, patés) num valor máximo de 202  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Frutos do mar incluindo camarão, caranguejo, berbigão, amêijoia branca, lula e peixe foi detetado BPA na concentração de 13,3 a 213,1  $\mu\text{g/kg}$  (Hanafi et al., 2019).



**Figura 3.7:** Estrutura química do Bisfenol A (4,4'-(propano-2,2-diil) difenol). **Fonte:** (Sarria-Villa et al., 2019).

### 3.8.1. Presença de Bisfenol A em humanos

Segundos estudos de biomonitorização em humanos o BPA já foi detetado em fluidos biológicos, incluindo sangue, líquido amniótico, leite materno, tecido adiposo, cabelo e urina, inclusive foi detetados BPA em baixas concentrações nos tecidos e fluidos em mais de 90% da população humana na Europa (Covaci et al., 2015) e EUA (Calafat et al., 2008).

Um estudo, recentemente publicado, avaliou BPA na urina em 2741 adultos em 11 países europeus, incluindo Portugal, foi detetado uma média de 1.3  $\mu\text{g/g}$  creatinina (CRT) de BPA (Govarts et al., 2023). Além disso, estudos nos modelos *in vivo*, confirmaram a capacidade de BPA, em atravessar a barreira placentária, em ratos, que foi também confirmado nos estudos de biomonitorização humana, onde foi detetado a presença de BPA no soro materno e fetal e no tecido placentário humano (Schönfelder et al., 2002; Takeda et al., 2009). No entanto, segundo estudos, essas baixas concentrações encontradas nos estudos de biomonitorização humana, induziu efeitos adverso nos modelos *in vivo*, incluindo alterações no sistema endócrinos, na reprodução, no metabolismo e alterações epigénicas (Mendonca et al., 2014; Vandenberg et al., 2010).

Desse modo, a União Europeia (UE) proibiu a aplicação de BPA como aditivo e auxiliar de produção de polímeros na produção de plásticos de contato com alimentos sob o Regulamento (CE) nº de outubro de 2011 (CE, 2018). No entanto, em Dezembro de 2021, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) emitiu um parecer e propôs redução da ingestão diária tolerável de BPA de  $4 \mu\text{g kg de peso corporal (pc)}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , estabelecida em 2015 para  $0,04 \text{ ng kg de peso corporal (pc)}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (Stecca et al., 2022). Portanto, dada a inevitável contaminação de PS-NPs e BPA no ambiente natural, incluindo na contaminação dos alimentos de uso diário e uso na nanotecnologias, particularmente na entregas de medicamentos, os potenciais riscos e impacto do BPA e PS-NPs nas células gástricas, a nível celular e sub-celular, precisam ser esclarecidos (Tang et al., 2022).

Entretanto, mesmo que os extensos estudos experimentais com várias evidências e cada vez mais consistentes dos efeitos da exposição do BPA na população humana, não encontraram causalidade associados os efeitos na população humana. Aliás um dos aspetos que não favorecem a avaliação dos efeitos do BPA, quer em estudos de toxicidade experimental, quanto em humanos é a sua relação dose-respostas não monótona, que são características típicas de hormônios endógenos. Uma vez que estudos confirmaram que o efeito foi observado em concentrações menores do que as consideradas seguras pela EFSA, em 2015 (Vandenberg et al., 2019). Portanto, há uma crescente preocupação pública sobre seu efeito nocivo, uma vez que os seres humanos estão constantemente expostos a tais poluentes (Kim et al., 2021).

Existe vários estudos nos modelos *in vivo*, que evidenciaram os efeitos negativos do BPA no sistema reprodutor como a redução da produção e a qualidade de espermatozoides em machos, diminuição de número de ovócitos maduros e aumento da indução da infertilidade em fêmeas (Ehrlich et al., 2012; Greca et al., 2020). Além disso, BPA é bem conhecido como desregulador endócrino (EDC's) (Kim et al., 2021), mas também esta associação a diabetes tipo 2, distúrbios cardiovasculares, doenças neurocomportamentais e vários tipos de cancro (Rezg et al., 2014). Além disso, estudos relataram efeitos adversos do BPA nomeadamente alterações epigenéticas específicas do sexo no cérebro, resultante da exposição em baixas doses (ou concentrações ambientais) nos modelos *in vivos*, incluindo em rato, que foram encontrados nos fluidos biológicos humanos. (Kundakovic et al., 2013). Todavia, a maioria dos estudos com o BPA estão dirigidas para o sistema reprodutor e à sua atividade antiestrogénios (Kim et al., 2021). Entretanto, poucos estudos estão disponíveis sobre os efeitos do BPA no sistema gastrointestinal (Abo-Elsoud et al., 2022).

### **3.8.2. Classificação Toxicológica de BPA**

Tendo em conta, as evidencias confirmados em estudos nos modelos *in vivo* e *in vitro*, as autoridades competentes e reguladores adotaram algumas normas sobre o consumo de BPA,

em alguns produtos (Kim et al., 2021). Em 2010 o Canadá proibiu a fabricação, importação, propaganda ou venda de biberões de policarbonato contendo BPA com base em desfechos de saúde comportamental e de neurodesenvolvimento<sup>(</sup> (Mendonca et al., 2014). E um ano mais tarde a UE proibiu o BPA em biberões e estabeleceu um limite para a quantidade de BPA que pode ser transferido para os brinquedos de crianças até aos três anos, incluindo os brinquedos levados á boca das crianças (ASAE, 2011).

Em 2011, a União Europeia (UE) proibiu o uso de BPA como aditivo e em produção de polímeros na produção de plásticos em contacto com os alimentos ao abrigo do Regulamento (CE) n.º de outubro de 2011, que atualizado em 2018, segundo o regulamento n.º 213, de 12 de fevereiro de 2018, sobre o uso de BPA (CE, 2018).

Em 2017 a agência de produtos químicos Europeia (ECHA) classificou o BPA, como tóxico reprodutivo (ECHA, 2017). Além disso propôs a identificação e rotulagem em todos os produtos fabricados com o sem BPA. Já em 2022, a ECHA, identificou o BPA, como uma substância de grande preocupação (SVHCs) e propôs também a identificação como SVHC, ou então a classificação e rotulagem para outros bisfenóis, já que estudos recentes associam os bisfenóis substituto de BPA, como EDC's (ECHA, 2022).

Existe um regulamento (UE) n.º 10/2011/UE que autoriza o uso de BPA como monómero em materiais de plástico que entra contacto com os produtos alimentares, entretanto, segundo o site de Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), em fevereiro de 2018, a UE reduziu o limites na quantidade de BPA nos artigos que entram em contacto com os alimentos de 0,6 mg/kg proposta em 2002 para 0,05 mg/kg na sequência do parecer de 2015 da EFSA (EFSA CEF Panel, 2015).

Em Dezembro de 2021, a EFSA publicou uma consulta pública sobre o parecer científico sobre a reavaliação dos riscos para a saúde pública e a redução da TDI de 4 µg/kg PC/dia (TDI temporário) em 2015 para 0,04 ng/kg PC/dia, tendo em conta os efeitos adversos do BPA no sistema imunitário, segundo Projeto de parecer da EFSA (Deepika et al., 2022). Recentemente, em abril de 2023, a EFSA, lançou uma reavaliação da segurança do BPA, de forma a diminuir a dose diária admissível (DDA) para 0,2 ng (por quilograma de peso corporal por dia, substituindo o nível temporário anterior de 4 microgramas (4 milésimos de grama) por quilograma de peso corporal por dia, (Lambré et al., 2023).

### **3.8.3. Efeito de BPA na saúde humana e sistema gastrointestinal**

A metabolização do BPA dentro do corpo é considerada um processo rápido, mas não completo, portanto, não é eliminado todo o conteúdo de BPA ingerido ou absorvido, ou seja, pode se acumular no organismo. Após a ingestão via dieta, o BPA é absorvido imediatamente

pelo trato gastrointestinal, é metabolizado no fígado e intestino (Bernardo et al., 2015). A maioria das metabolizações do corpo, ocorre no fígado, quer seja para absorver, guardar ou fornecer os nutrientes para o organismo.

O Mecanismo de metabolização do BPA pelo organismo, é possível através de reações enzimáticas, as quais são divididas em duas fases: fase I e fase II. Na fase I aparecem na maioria, reações de oxidação catalisadas pelo citocromo P450 (Ramadori et al., 2008). Na fase II são reações de conjugação onde o metabolito é conjugado com outra molécula através de enzimas (Ramadori et al., 2008). Portanto na fase 1, praticamente não sofre muitas transformações, isto é, consistem em reações redox ou de hidrólise que degradam parte das moléculas absorvidas formando diversos tipos de metabólitos (Bernardo et al., 2015). No fígado, o BPA não é extensamente metabolizado nas reações de fase I mas sim nas reações de conjugação de fase II. Assim os subprodutos formados pelo fígado são o BPA- glucuronido (BPAG) em grande maioria e o BPA-sulfato (BPAS) que se encontra numa quantidade menor (Bernardo et al., 2015; Vandenberg et al., 2013). O BPAG é controlado pela UGT2B15, uma enzima uridina difosfato glucuroniltransferases (UGTs), e o BPAS é regulado pela SULT1A1, que é uma enzima sulfotransferase (SULT) (Deepika et al., 2022). O análogo BPA-G é convertido em monoglucuronido (BPA-MG) e em BPA diglucuronide (BPA-DG) e o BPA-S em monossulfato (BPA-MS) e dissulfato (BPA-DS) (Dahl et al., 2008; Ginsberg & Rice, 2009).

Quando o BPA-G e BPA-S são formados no trato gastrointestinal e no fígado são transportados para o sangue através do sistema endócrino, e excretado através dos rins na urina, podendo ainda ser excretado até no leite materno (Encarnação, 2007; Ola-Davies & Olukole, 2018).

Segundo estudos anteriores, o BPA, pode ser completamente excretado depois de 24 h após ingestão oral em glucuronido ou sulfato conjugados na urina (Völkel et al., 2002). E estimaram que 84-97% do BPA absorvido são excretados nas primeiras 5-7 horas (Thayer et al., 2015). Contudo, em estudos atuais sugere-se que a excreção pode ser mais lenta e longa após exposição da pele (Sasso et al., 2020). O BPA livre ou não conjugado é considerado a forma química toxicologicamente mais relevante, uma vez que pode interagir com o recetor de estrogênio (RE). No entanto, segundo estudos anteriores as concentrações sanguíneas e urinárias de BPA livre são geralmente muito menores do que as de BPA conjugado.

O BPA, por ser um xenoestrogênio pode imitar hormônios, incluindo o estrogênio, portanto, pode se ligar a vários tipos de recetores de estrogênio, de forma a desencadear múltiplas respostas, resultante em diversos efeitos adversos no organismo. Além dos efeitos endócrinos (EDCs), estudos associam a exposição do BPA a alterações no neurodesenvolvimento (Roan et al., 2015), obesidade, distúrbios metabólicos (Deepika et al., 2022) e alteração na

reprodução, incluindo a diminuição da viabilidade de células específicas que pode levar à formação anormal de espermatozoides, menor contagem de espermatozoides e motilidade relatados nos estudos *in vivo* em ratos (Harnett et al., 2021) e em humanos segundo estudos em ambientes ocupacionais (Ribeiro et al., 2017).

A nível celular o BPA, induz efeitos citotóxicos através da produção de estresse oxidativo, resultante do aumento da produção de ROS, alteração na atividade antioxidante, ou acúmulo de produtos de oxidação de biomacromoléculas e efeitos genotóxicos ou danos de DNA (Kaur et al., 2014; SG et al., 2019).

Além disso, o BPA, por ser um EDC's têm uma curvas de resposta de dose não monotónica (NMDR), que é definida segunda EFSA como uma função da dose na qual a inclinação da curva dose-resposta muda de sinal (Beausoleil et al., 2017). As curvas NMDR apresentam uma formas em U, U invertidas ou complexas com mais de um ponto de virada (NRC, 2014).

Portanto, é uma dificuldade adicional para caraterização do seu risco, uma vez que não encaixar nos clássicos métodos de avaliações de risco toxicológico (dose resposta monótona). (Vandenberg, 2014; Welshons et al., 2006). Uma outra dificuldade que resulta resposta divergentes é o efeito de “baixa dose”, que foi definido segundo a Agência de Proteção Ambiental (USEPA) como efeitos relatados em concentrações abaixo dos níveis usados para avaliações toxicológicas clássicas (Oliveira, 2017). Segundo a literatura, concentrações muito baixas são capazes de estimular a regulação positiva do recetor, resultante em efeitos adversos, (Myers et al., 2009).

Contudo, o foco desse estudo centra se nos efeitos toxicológicos, nomeadamente efeitos citotóxicos e genotóxicos no sistema gastrointestinal *in vitro*. Escolhemos concentrações baixas, consideradas ambientais, utilizados nos estudos anteriores (Ramos et al., 2019) e concentrações encontradas nos fluidos biológicos nos estudos de biomonitorização humana, nomeadamente, 0,04, 0,1 e 1 ng/mL, sendo que a concentração 0,04 ng/ mL é o valor de referência de TDI proposta recentemente pela EFSA (Deepika et al., 2022). Além disso, segundo estudos em modelos animais, o sistema GI, incluindo o estomago e intestino são os primeiros a serem afetados após a exposição do BPA através da alteração na flora intestinal, alteração na glândula gástrica, destruição da função de barreira das células epiteliais intestinais (Javurek et al., 2016), lesões na mucosa intestinal, inibição da secreção de mucina (Ola-Davies & Olukole, 2018) mediada através de biomarcadores de stress oxidativo, biomarcadores de apoptose e biomarcadores inflamatórios (Abo-Elsoud et al., 2022).

Segundo a literatura os efeitos toxicológicos do BPA no tecido gástrico, são gerados através da indução do stress oxidativo, inibição da atividade das enzimas antioxidantes, redução da expressão génica das enzimas antioxidantes, resultante na alteração da função das

mitocôndrias (Kaur et al., 2014; SG et al., 2019) e indução de expressão proteica de citocinas pró-inflamatórias e biomarcadores pró-apoptóticos, que estão associados a patologias gástricas (Abo-Elsoud et al., 2022).

Contudo, dados sobre os riscos do BPA, no sistema gastrointestinal, ainda estão insuficientemente (Abo-Elsoud et al., 2022).

Um estudo simulou um ecossistema microbiano do intestino humano (SHIME), relatando que a exposição ao BPA, induziu alterações na microflora do cólon (ascendente, transversa e descendente) e aumentou a proliferação de bactérias patogênicas degradáveis por BPA (*Microbacterium* e *Alcaligenes*) (Wang et al., 2018). Outro estudo investigou a exposição de BPA em células gástricas -HGC-27 com concentrações abaixo do TDI de referência de EFSA de 2015 diferentes linhas de tempo (24, 48 e 72 horas), demonstrando alteração na viabilidade celular, resultante na alteração de fator actina (F-actina) (Hanafi et al., 2019), que tem a função de gerar energia para processos bioquímicos e determinar a forma de célula e a sua desregulação induz atraso no ciclo celular em oócitos durante a meiose (Can et al., 2005).

A grande maioria dos dados na literatura dos efeitos de BPA, no sistema gastrointestinal é nos modelos *in vivo*. Neste caso, Abo-Elsoud et al., 2022, investigou os efeitos do BPA, no ratos, relatou alterações gástricas através de respostas antioxidante, anti-apoptótica e anti-inflamatória, que esta associada à úlcera gástrica e cancro (Abo-Elsoud et al., 2022). Outro estudo, avaliou a exposição oral de BPA, na concentração de 0,5 µg/kg de P.C durante 1 mês, o BPA induziu danos na glândulas gástricas, danos no DNA, (Ismail & El-Meligy, 2022). Em peixes de água doce (*Ictalurus punctatus*), foram relatadas alterações hepatológicas e disbiose da microbiota intestinal através de estresse oxidativo, mediadas através de atividades enzimáticas antioxidantes do intestino e respostas inflamatórias imunes, medidas através de genes associados à imunidade (Zheng et al., 2023).

A nível *in vitro*, usando concentrações de BPA ambientais (parecidos do nosso estudo), para investigar os efeitos citotóxicos e genotóxicos de BPA e a interação com agentes quimioterápicos - doxorubicina (DOX) em duas linhas celulares - epiteliais humanas tipo 2 (Hep-2) e os fibroblastos pulmonares (MRC-5) observaram que o BPA induziu um aumento de micronúcleos (MN) nas duas linhas celulares (Ramos et al., 2019).

### **3.9- O efeito toxicológico da exposição combina de NPs e BPA**

Os seres humanos estão inevitavelmente expostos a vários produtos químicos em simultâneo, através da alimentação, ar, produtos domésticos, equipamentos médicos e eletrônicos e produtos cosméticos (Evans et al., 2016). Em prol disso, atualmente, tem havido um interesse exponencial, em estudos sobre os efeitos de riscos de misturas químicas (Tsatsakis et al.,

2017). A Avaliação do Risco de Mistura (MRA), foi definida como uma avaliação de risco cumulativo para a organismo e para o meio ambiente devido a exposições combinadas de produtos químicas através de várias fontes de exposição (Evans et al., 2016).

Segundo a EFSA, substâncias com mesmo efeitos no mesmo órgão, são considerados efeitos aditivas (quando o efeito dos dois produtos químicos em exposições combinadas é igual à soma do efeito da exposição individual), mesmo com estruturas químicas e mecanismos moleculares diferentes (Mantovani, 2015). Contudo, os efeitos aditivos não são os únicos mecanismos de toxicidade de misturas (Ribeiro et al., 2017). Tendo em conta a classificações toxicológicas das exposições combinadas de misturas químicas, além de aditivas, podem ser: sinérgico – quando o efeito da exposição combinada é superior que a soma de seus efeitos individuais; e antagônicos – quando o efeito da exposição combinada é inferior do que seus efeitos individuais (Yeh et al., 2009). Os PS-NPs devido as suas propriedades inclusive sua área superficial, permite a adsorção de poluentes, resultando em modificações nas suas propriedades físico-químicas induzindo efeitos na toxicidade (Gallo et al., 2020; Sørensen et al., 2020).

Em consonância com isso, existe evidências que o BPA, assim como as NPs podem desencadear efeitos, aditivas em exposição individuais no mesmo organismo, como também pode desencadear efeitos antagônico no mesmo organismo, em exposição combinadas segundo estudos nos modelos *in vivo* e *in vitro* (Bolli et al., 2010; Jordan et al., 2012; Wilson et al., 2016). Entretanto, não existem ainda dados suficientes sobre a exposição combinada de PS-NPs com outros poluentes ambientais, especialmente o BPA. Um estudo investigou a exposição combinada de BPA e E2 na linha celular de cancro de cólon DLD-1, relataram teve efeito antagonista na ação pró- apoptótica, através da inibição da atividade de cascatas (Bolli et al., 2010).

Outro estudo investigou a toxicidade de PS-MPs em tamanho micro e nano antes e depois da absorção de BPA, na linha celular caco-2 de cancro de colón humana, demonstraram que houve um aumento da citotoxicidade, associados a aumento do estresse oxidativo celular, resultante da produção de espécies reativas de oxigênio e da despolarização de mitocôndrias (Q. Wang et al., 2020). Além disso, relataram que os PS-MPs em nanoescala, tiveram maior taxa de absorção de BPA, devido a sua grande superfície específica de absorção de BPA, resultando uma maior taxa de citotoxicidade (Q. Wang et al., 2020).

Um outro estudo, avaliou a exposição combinadas de BPA em concentrações ambientais com doxorubicina (DOX), nas linhas celulares epiteliais humanas tipo 2 (Hep-2) e nos fibroblastos pulmonares (MRC-5), sugeriu que o BPA teve efeito antagonista nos efeitos da DOX, que é

um quimioterápico, além disso, relatou que a exposição combinada na linha celular MRC-5 desencadeou uma curva de resposta não monotónica (Ramos et al., 2019).

Estudo nos modelos *in vivo* avaliou a exposição individual e combinada de BPA (2000 mg/kg), com NPs (600 mg/kg), invertebrado *Folsomia cándida*, demonstraram que a exposição individual de NPs em concentrações ambientais (0,015 mg/kg) provocou aumento dos níveis de peroxidação lipídica (Barreto et al., 2023). Contudo a exposição combinada com as mesmas concentrações de NPs (0,015 mg/kg) e de BPA (2000 mg/kg) não obteve nenhum efeito (Barreto et al., 2023). Portanto o efeito nas exposições combinadas teve o efeito antagónico (Barreto et al., 2023). Outro estudo recente no modelo *in vivo* com peixe de água doce (*Ictalurus punctatus*), investigou a exposição individual e combinada BPA e PS-NPs, observaram que a exposição combinada de BPA e PS-NPs desencadeou toxicidade sinérgica comparada a exposição individual do PS-NPs e BPA (Q. Wang et al., 2020).

Por outro lado, Cheng et al. 2023, avaliou a exposição individual e combinadas de BPA e MPs (1 µm) observaram efeitos sinérgicos, através de um aumento da hepatotoxicidade nas células-tronco pluripotentes humanas (Cheng et al., 2023).

Além disso, estudo de misturas de substâncias tóxicas *in vitro* é ainda limitado (Clérigo et al. 2022), principalmente estudos de exposição combinada de NPs com plastificantes, dado o papel de MPs e NPs como vetores de poluentes químicos e micro-organismo para células e organismos (Blackburn 2022; Campanale et al. 2020; Sangkham et al. 2022). É importante, necessário e imediato avaliar os efeitos PS-NPs e plastificantes na saúde humana.

### **3.10- Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias químicas e misturas**

#### **3.10.1. Ensaio de Citotoxicidade**

Os ensaios de citotoxicidade são usualmente utilizados para avaliação dos efeitos sobre a viabilidade ou proliferação celular causada pelas exposições dos tratamentos testados.

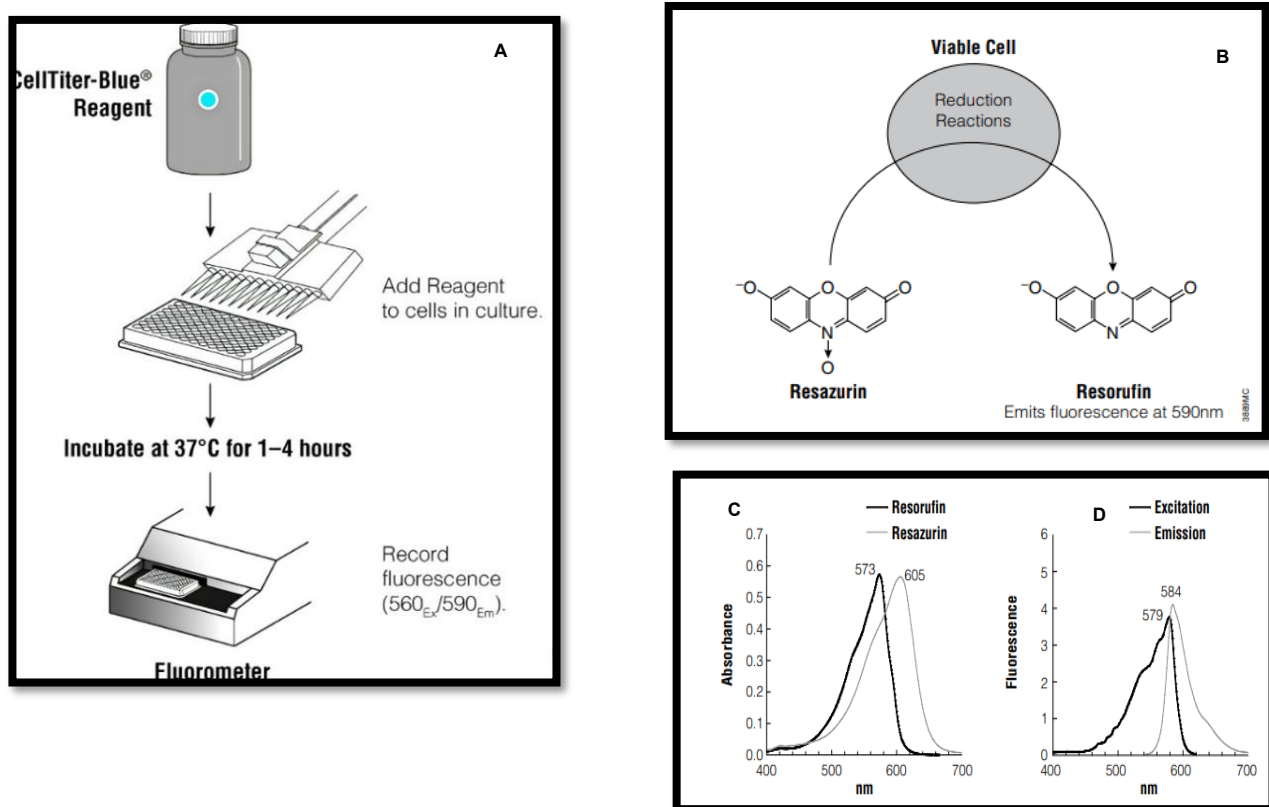
Há vários tipos de ensaios utilizados para investigar a citotoxicidade, uns baseiam-se nas alterações da permeabilidade celular, como o uso de corantes vitais, (azul de trípano, preto de naftaleno, eosina, etc.), outros nas funções mitocondriais (ex. ensaio do MTT, XTT, etc.). Todavia, no presente estudo a avaliação de citotoxicidade, baseou-se na avaliação da capacidade metabólica celular, através do ensaio CellTiter-Blue® (Promega).

##### **3.10.1.1. CellTiter-Blue®**

Neste ensaio é monitorizada a viabilidade celular, utilizando um método homogénico e fluorescente. A base desse ensaio é a capacidade das células viáveis em converter um

corante redox (resazurina) em um produto final com fluorescência (resorufina) (Promega, 2019). A resazurina é um corante indicador permeável a células, de cor azul-escuro com pouca fluorescência intrínseca. Neste ensaio usa resazurina para medir a viabilidade celular, dada que só as células viáveis com metabolismo ativo podem reduzir a resazurina em resorufina, que é rosa e fluorescente. É método homogêneo, porque durante o ensaio é adicionado diretamente às células cultivadas, após os tratamentos químicos, um único reagente. Após 1 a 4 horas de incubação, o sinal é quantificado usando um espectrofotômetro de microplacas ou fluorômetro (**Fig. 3.8**).

É um método barato, fácil, sensível e altamente rentável (pode ser feito tanto em placa de 96, como também para 384 poços). O reagente não é tóxico para as células, por isso não precisa de cuidados nos descartes de solventes, comparadas com o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2-5-difeniltetrazólio).



**Figura 3.8:** Ensaio CellTiter-Blue®. **A:** Protocolo: envolve a adição de um único reagente (CellTiter-Blue® Reagent) diretamente às células cultivadas em meio suplementado com soro. Após uma etapa de incubação, os dados são registrados utilizando um fluorômetro ou espectrofotômetro **B:** A conversão da resazurina em resorufina por células metabolicamente ativas resulta na geração de um produto fluorescente. **C e D:** Propriedades espectrais da resazurina e resorufina em RPMI + 10% de soro fetal bovino: **C** (Absorvência espectros para resazurina e resorufina); **D:** (Espectros de excitação e emissão de fluorescência para resorufina). **Fonte:** (Promega, 2019).

### 3.10.2. Genotoxicidade

O ensaio de genotoxicidade, *in vitro*, é uma das ferramentas essenciais para a detecção da genotoxicidade e carcinogenicidade dos agentes químicos ou físicos (Eisenbrand et al., 2002; MacGregor et al., 2000). Neste estudo avaliamos a genotoxicidade, através do ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN).

#### 3.10.2.1. Ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN)

O ensaio de micronúcleos por bloqueio de citocinese (CBMN) é considerado um teste citogenético padrão para testes toxicológicos genéticos em células humanas e mamíferos (Fenech et al., 2011).

É um ensaio confiável e com bastante reprodutibilidade, adequado para diversos tipos de células e com alternativa para outros ensaios de genotoxicidade mais complexos, como o ensaio de aberrações cromossômicas.(Fenech et al., 2011).

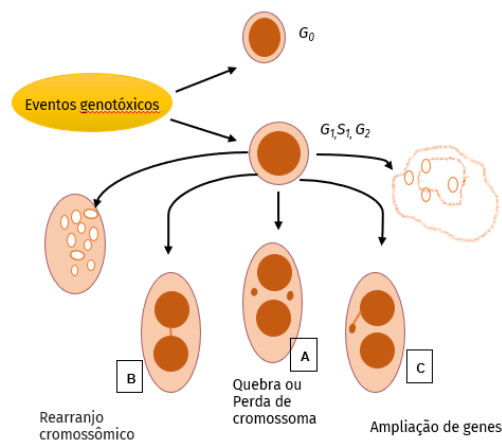
O ensaio de CBMN, baseia-se na indução de micronúcleos, nas células que completaram a mitose. Pode ser utilizado com protocolo com a adição de citocalasina B (cytoB) ou sem adição de cytoB. A cytoB é um inibidor de polimerização de actina citocalasina, que caso adicionado antes da mitose origina células binucleadas, por isso, os MNPs devem ser apenas analisadas nas células que completaram a mitose (células binucleadas) (Fenech & Morley, 1985; Kirsch-Volders et al., 2003).

Este ensaio, além de avaliar os efeitos citostáticos - através de células mononucleadas (um núcleo), binucleadas (dois núcleos) e multinucleadas (mais de 3 núcleos). Além da identificação de MN (**Fig. 3.9A**), o ensaio de CBMN é amplamente utilizada para avaliar biomarcadores de eventos genotóxicos e instabilidade cromossômica incluindo, biomarcadores de quebra ou perda cromossômica- micronúcleos (MN); biomarcador de rearranjos cromossômicos - pontes nucleoplasmáticas (NPBs) (**Fig. 3.9B**), biomarcador de eliminação de DNA amplificado - Protusões nucleares (NBUDs) (**Fig. 3.9C**). Como também pode avaliar a citotoxicidade através de quantidade de células necróticas e/ou apoptóticas (**Fig. 3.9**) (Fenech et al., 2011). Os NPB são formados quando as células estão na mitose, em que a membrana nuclear envolve os núcleos filhos e a ponte da anáfase Enquanto, os NBUDs são equiparados ao MN, relativamente a morfologia, contudo o NBUD, está ligada ao núcleo por uma haste de material nucleoplasmático (Fenech et al., 2011).

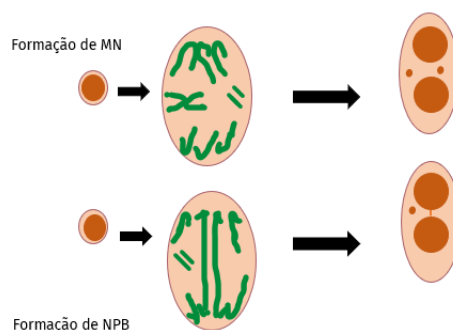
Os MN representam danos que foram transmitidos às células-filhas, enquanto as aberrações cromossômicas os danos podem não ser transmitidas (Kirsch-Volders et al., 1997).

Este ensaio permite identificar dois tipos de eventos associados ao dano cromossômico *in vitro*, os efeitos aneugénicos (número anormal de cromossomas) e clastogénicos (quebra cromossômica (Sierra & Gaivão, 2014). Além disso, podem ser identificados em células que já tiveram divisão celular durante ou após a exposição das misturas químicas (Parry & Sors, 1993).

O ensaio *in vitro* de micronúcleos (MNvit), baseia-se na identificação de micronúcleos (MN) no citoplasma de células interfásicas, resultante da fragmentação de cromossomos acêntricos (sem centrômero) e ou por fragmentação da cromatina, (devido as quebras não reparadas do DNA ou reparo incorreto) ou por perda de cromossomas inteiros que não foram capazes de se ligarem ao fuso mitótico, não foram levados para polos opostos durante a anáfase (**Fig. 3.10**) (Fenech et al., 2011).



**Figura 3.9:** Biomarcadores do dano de DNA, através do ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN) Formação do micronúcleo. **A:** Micronúcleo (MN); **B:** Ponte nucleoplasmático (NPB); **C:** Protusão nucleares (NBUD).  
**Fonte:** Adaptação (Fenech et al., 2011).



**Figura 3.10:** Formação de micronúcleo. **Fonte:** Adaptação (Fenech et al., 2011).

### 3.10.3- Células Gástricas GP202

O cancro gástrico é o quinto cancro mais frequente em 2020 no mundo, em Portugal e a quinta causa mais prevalente de morte á nível mundial, segundo o último relatório da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2023).

As células gástricas GP202, são considerados um excelentes modelos para estudar os efeitos celular e sub-celular da patologia gástrica, por serem imortalizadas, particularmente a proliferação celular e a instabilidade genómica, que são considerados os mecanismos moleculares subjacentes associados a carcinogénese gástrica (Gärtner et al., 1996). Além disso, nos modelos *in vivo*, a maioria dos NPs são encontrados no GI (Vecchiotti et al., 2021).

As células gástricas humana GP202, pertencem a linhagem celular de carcinoma gástrico difuso humano, que são conhecidas como células cancerígenas que se originam do revestimento do estômago (Gärtner et al., 1996). São caracterizada por terem estruturas das junções intercelulares pouco abundantes a nível ultraestrutural e por crescem em cultura como uma monocamada fina compactada (Gärtner et al., 1996). São células epiteliais com morfologia hexagonal ou em forma de sinete e no citoplasma das células possui pequenos vacúolos de mucina (Gärtner et al., 1996) (Fig.4.12).

## 4- Metodologia

Tendo em conta os nossos objetivos, delineamos o seguinte desenho de estudo, que esta ilustrado na Fig. 4.11:

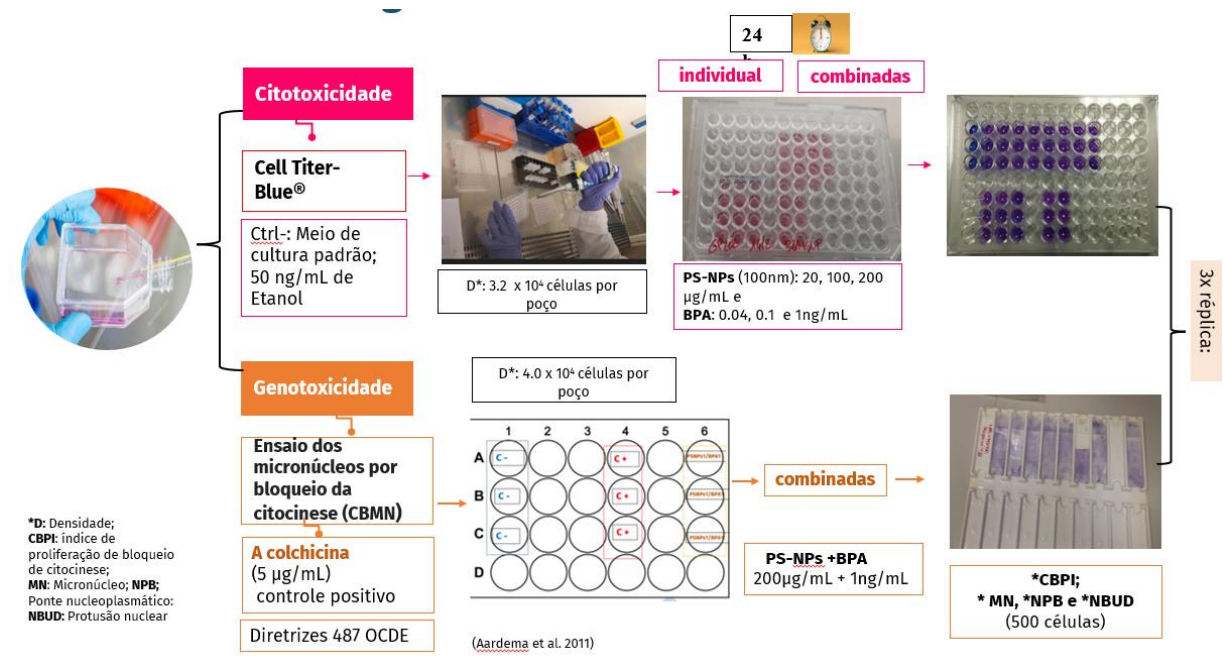


Figura 4.11: Desenho do estudo experimental *in vitro*.

#### 4.1- Tipo de Estudo

O presente estudo caracteriza-se por ter um método de estudo experimental, segundo Fortin estudo experimental é caracterizada pela relação de causalidade, em que se faz uma intervenção e presume produzir um efeito (Fortin, 1999).

#### 4.2- Local de estudo

Este estudo foi realizado nos laboratórios do Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC) da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL).

#### 4.3- Variáveis

Neste estudo as variáveis dependentes são os efeitos celulares quantificados através da avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade e as variáveis independente são as concentrações de PS-NPs e BPA (individuais e combinadas) conforme ilustra a **Tabela 4.2**.

**Tabela 4.2:** Variáveis dependentes e independentes.

<b>Variáveis dependentes</b>	Avaliação da citotoxicidade ( <b>CellTiter -Blue® Cell Viability Assay</b> ) Avaliação da instabilidade genómica ( <b>CBMN</b> ),
<b>Variáveis independentes</b>	As concentrações individuais de BPA de 1 ng/mL, 0,1 ng/mL e 0,04 ng/mL As concentrações individuais de PS-NPs de 200 µg/mL, 100 µg/mL e 20 µg/mL As concentrações combinadas de BPA/PS-NPs de 1 ng/mL/200 µg/mL; 0,1ng/mL/200 µg/mL; 0,04 ng/mL/200 µg/mL; e PS-NPs/BPA 100 µg/mL/1 ng/mL, 200 µg/mL/1 ng/mL

#### 4.4- Procedimentos laboratoriais

##### 4.4.1- Cultura celular

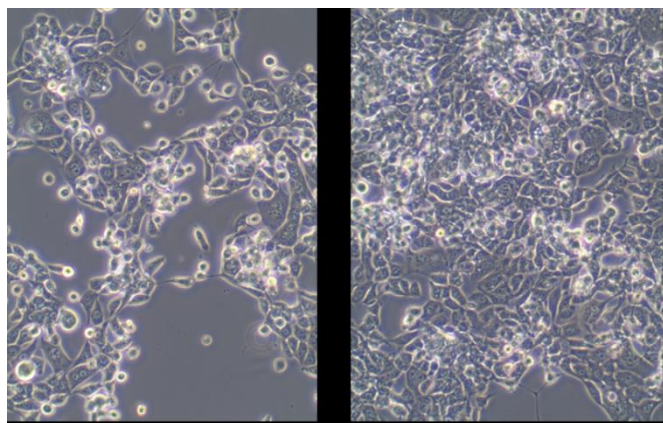
A cultura celular é um processo pelo qual são retiradas células de animais ou de plantas e cultivadas em condições ambientais artificiais adequadas (Hartung et al., 2002). Para esse estudo experimental foi utilizada a linha celular tumoral gástrica GP202 (RRID: CVCL\_S967), adquiridas do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

(Ipatimup). A linha mãe foi obtida de carcinoma gástrico primário difuso de um homem de origem europeu de 53 anos. Esta linha celular é composta por células epiteliais aderentes com uma morfologia hexagonal ou em forma de sinete (Gärtner et al. 1996), conforme mostra a **Fig. 4.12** e a **Tabela 4.3**. Os reagentes para o cultivo foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich-Merck®. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 com L-glutamina, suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS), e 1% de estreptomicina e penicilina, usando frascos T25 (volume de 5 mL).

Antes do estudo as células estavam congeladas (-80°C). Para a sua utilização, as células foram descongeladas numa estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Para minimizar o risco de contaminação, todos os procedimentos foram realizados em uma câmara de fluxo laminar previamente submetidos à radiações ultravioleta por 30 minutos antes e depois o uso e todos os objetos utilizados para a manipulação foram previamente limpos com álcool 70% (**Fig. 4.13**).

Em seguida, foram passadas as células lentamente (gota a gota), pipetadas de um criotubo para um tubo de 15 mL, em condições de esterilidade, numa câmara de fluxo laminar. Depois foram centrifugadas durante 5 minutos a 1500 rpm e após a centrifugação foi mantido o pellet, descartando o sobrenadante. Ao pellet foram adicionados 5 mL do meio de cultura no tubo, fazendo *up and down* cuidadosamente. Após isso, as células foram cultivadas, em frascos T25, com 3 mL de meio e 2 mL de células do tubo previamente preparado e foi colocado na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 2 dias foi realizada a troca do meio de cultura, descartando o meio usado com pipeta graduada estéril e foi adicionado 5 mL de meio novo (previamente aquecido).

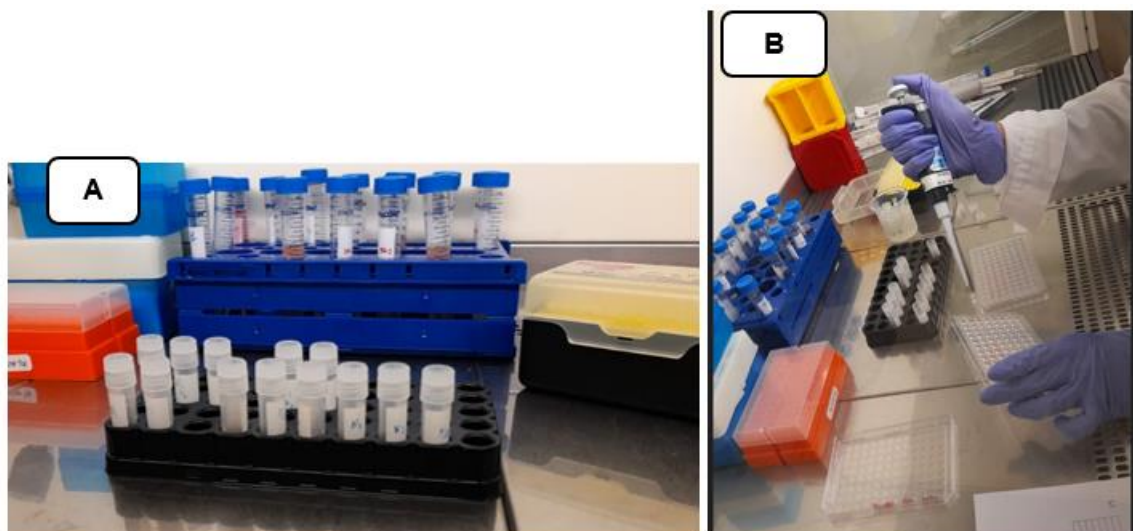
Uma vez atingida a confluência das células foi realizada a passagem das mesmas, em ambiente estéril sobre a câmara de fluxo laminar, para isso, o meio de cultura usado foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS (livre de cálcio/magnésio), de seguida foi adicionada 1 mL de tripsina e incubadas cerca de 5 minutos a 37°C ou até que as células desagregaram das paredes do frasco de cultura. Para confirmar se as células estavam desagregadas das paredes, os frascos foram observados ao microscópio ótico invertido. Após a desagregação por digestão enzimática da tripsina, foi adicionado de cerca do dobro de meio de cultura novo (2mL), com FBS presente no meio para inativação da tripsina.



**Figura 4.12:** Células GP202 24h após descongelamento (10x), com a morfologia hexagonal das células epiteliais.  
**Fonte:** (<https://www.ipatimup.pt/FileMgr/DownloadFile.aspx?SelectedNodeId=2327>), cessado no dia 27 de fevereiro de 2023.

**Tabela 4.3:** Características da linha celular GP202 (RRID: CVCL\_S967). Fonte:(Gärtner et al. 1996).

<b>Categoria de produto</b>	<b>Células humanas</b>
<b>Linha celular</b>	GP202 / GP-202
<b>Espécie de origem</b>	Homo sapiens humano (Humano) (Taxonomia NCBI: 9606)
<b>idade</b>	53 anos
<b>categoria</b>	Linhagem da célula cancerígenas
<b>adesão</b>	CVXL_S967
<b>Género</b>	Macho
<b>Doença</b>	Adenocarcinoma gástrica de células em anel de sinete (NCIt: C5250)
<b>Morfologia</b>	Célula epitelial com morfologia hexagonal (ou em forma de sinete)
<b>Propriedades de crescimento</b>	Aderente (monocamada fina compacta)



**Figura 4.13:** Matérias e reagentes. **A:** Câmara de fluxo laminar. **B:** Matérias e reagentes utilizados para a cultivo de célula GP 202, sobre a câmara de fluxo laminar. **Foto** Inédita

#### 4.4.2- Tratamento/ Exposição química

Bisfenol A (BPA, número CAS: 80-05-7) e os PS-NPs foram adquirido da Sigma-Aldrich. Foram usadas soluções de suspensão recém-preparadas. Os PS-NPs foram dissolvidas em água estéril e o etanol absoluto foi utilizado como veículo dispersante do BPA. As soluções de trabalho foram realizadas com RPMI 1640 e as concentrações finais de BPA foram 1 ng/mL (BPA<sub>1</sub>), 0,1 ng/mL (BPA<sub>2</sub>) e 0,04 ng/mL (BPA<sub>3</sub>) e para PS-NPs foram 200 µg/mL (NP<sub>1</sub>), 100 µg/mL (NP<sub>2</sub>) e 20 µg/mL (NP<sub>3</sub>) (**Fig. 4.14**).

#### 4.4.3- Preparação da Solução química

##### 4.4.3.1. BPA

A solução stock de 100 µg/mL (ou  $1 \times 10^5$  ng/mL) de BPA foi preparada por dissolução de 1mg de BPA em 10 mL de etanol, como o seu veículo dispersante. A partir desta foi preparada uma solução trabalho (ST) de concentração de  $1 \times 10^3$  ng/mL, usando 10 µL de solução stock de BPA em 990 µL de etanol, que serviu de base para a preparação das condições de exposição, como explicado abaixo.

Para a preparação de concentrações em meio completo e das soluções diluídas seguiu-se o seguinte esquema: para o BPA<sub>1</sub>: colocou-se 10 µL em 9990 µL meio, para o BPA<sub>2</sub>: colocou-se 1 mL BPA<sub>1</sub> em 9 mL meio e para o BPA<sub>3</sub>: foi 4 mL BPA<sub>2</sub> em 6 mL meio.

##### **BPA<sub>1</sub> (1 ng/mL)**

$ST (1000 \text{ ng/mL}) \times V_1 = BPA_1 (1 \text{ ng/mL}) \times 10 \text{ mL} \Leftrightarrow V_1 = 10 \mu\text{L}$ .

Desse modo, foi usado 10  $\mu\text{L}$  de ST e 9990  $\mu\text{L}$  de meio.

#### **BPA<sub>2</sub> (0,1 ng/mL)**

$BPA_1 (1 \text{ ng/mL}) \times V_2 = BPA_2 (0,1 \text{ ng/mL}) \times 10 \text{ mL} \Leftrightarrow V_2 = 1 \text{ mL}$ .

Ou seja, 1 mL de BPA<sub>1</sub> e 9 mL de meio.

#### **BPA<sub>3</sub> (0,04 ng/mL)**

$BPA_2 (0,1 \text{ ng/mL}) \times V_3 = BPA_3 (0,04 \text{ ng/mL}) \times 10 \text{ mL} \Leftrightarrow V_3 = 4 \text{ mL}$ .

4 mL de BPA<sub>2</sub> + 6 mL de meio, conforme representado na **Tabela 4.4**.

**Tabela 4.4:** Concentrações de BPA utilizadas para ensaio de Cell Titer e MN.

BPA	
Cell Titer	MN
<b>24 h</b>	
BPA <sub>1</sub> (1ng/mL)	BPA <sub>1</sub> (1ng/mL)
BPA <sub>2</sub> (0,1ng/mL)	
BPA <sub>3</sub> (0,04ng/mL)	

#### **4.4.3.2. PS-NPs**

As Nanopartículas de Poliestireno (PS-NPs) foram adquiridas com uma concentração nominal de 100 mg/mL. Desta solução comercial foi preparada uma solução de trabalho (ST) com uma diluição de 100x (1 mg/mL ou 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), ao adicionar 100  $\mu\text{L}$  da solução comercial a 9900  $\mu\text{L}$  de água destilada esterilizada ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

De modo a preparar o volume final de 10 mL (PS-NPs e meio de cultura) para cada condição de exposição, realizaram-se diluições sucessivas, a partir da solução de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , tal como explicado abaixo, conforme representado na **Tabela 4.5**.

**PS-NPs<sub>1</sub>** (concentração final 200  $\mu\text{g/mL}$ ):

$ST (1000 \mu\text{g/mL}) \times V_1 = PS-NP_1 (200 \mu\text{g/mL}) \times 10 \text{ mL} \Leftrightarrow V_1 = 2 \text{ mL}$

Como tal, o volume da ST de PS-NPs a adicionar foi de 2 mL e completado com 8 mL de meio. O volume de PS-NPs<sub>2</sub> foi obtido a partir da solução de PS-NPs<sub>1</sub> e assim sucessivamente como apresentado:

**PS-NPs<sub>2</sub>** (concentração final 100 µg/mL):

$$\text{PS-NPs}_1 (200\mu\text{g/ml}) \times V_2 = \text{PS-NPs}_2 (100\mu\text{g/mL}) \times 10\text{mL} \Leftrightarrow V_2 = 5\text{ml.}$$

Ou seja, 5 mL de PS-NPs<sub>1</sub> + 5 mL de meio.

$$\text{PS-NPs}_3 = \text{PS-NPs}_2 (100\mu\text{g/ml}) \times V_3 = \text{PS-NPs}_3 (20\mu\text{g/ml}) \times 10\text{ml} \Leftrightarrow V_3 = 2\text{ml.}$$

2 mL de PS-NPs<sub>2</sub> + 8 mL meio.

Um volume adicional de 5 mL (PS-NPs + meio) foi preparados para PS-NPs<sub>1</sub>, para os estudos de micronúcleos (MNs), seguindo a mesma fórmula acima.

**Tabela 4.5:**Concentrações de PS-NPs utilizadas para ensaio de Cell Titer e MN.

PS-NPs	
Cell Titer	MN
<b>24 h</b>	
PS-NPs <sub>1</sub> (200 µg/mL)	PS-NPs <sub>1</sub> (200 µg/mL)
PS-NPs <sub>2</sub> (100 µg/mL)	
PS-NPs <sub>3</sub> (20 µg/mL)	

#### 4.4.3.3. Exposições combinadas

Para as exposições combinadas, a preparação das condições seguiu a mesma lógica de diluições a partir da ST respectiva para PS-NPs e BPA.

##### **BPA<sub>1</sub> (1 ng/mL) + PS-NPs<sub>1</sub> (200 µg/mL)**

Nas exposições combinada, para o **BPA<sub>1</sub> + PS-NPs<sub>1</sub>** colocou-se 10 µL (DT BPA) + 2mL ST de PS-NPs + 7990 µL meio de cultura. Para **BPA<sub>2</sub> + PS-NPs<sub>1</sub>** colocou-se 0,5 mL BPA<sub>1</sub> + 1mL ST-PS-NPs + 3,5 mL meio; Para **BPA<sub>3</sub> + PS-NP<sub>1</sub>** colocou-se 2 ml BPA<sub>2</sub> + 1ml ST de PS-NPs + 2 mL meio. Para **PS-NPs<sub>2</sub> + BPA<sub>1</sub>** colocou-se 5 µL DT de BPA + 2,5ml PS-NP1 + 2495 mL meio. Para **PS-NPs<sub>3</sub> + BPA<sub>1</sub>** + colocar 5 µL DT de BPA + 1ml NP2 + 3995 mL meio, conforme representado na **Tabela 4.6**.

**Tabela 4.6:**Concentrações combinadas de BPA/PS-NPs utilizadas para ensaio de Cell Titer e MN.

BPA/PS-NPs	
Cell Titer	MN
<b>24 h</b>	
<b>BPA<sub>1</sub>/PS-NPs<sub>1</sub></b> (1ng/mL /200 µg/mL)	BPA <sub>1</sub> /NPs <sub>1</sub> (1ng/mL/200µg/mL)
<b>BPA<sub>2</sub>/PS-NPs<sub>1</sub></b> (0,1ng/mL/200 µg/mL)	
<b>BPA<sub>3</sub>/PS-NPs<sub>1</sub></b> (0,04ng/mL/200 µg/mL)	
<b>BPA<sub>1</sub>/ PS-NPs<sub>2</sub></b> (1ng/mL /100 µg/mL)	
<b>BPA<sub>1</sub>/ PS-NPs<sub>3</sub></b> (1ng/mL /20 µg/mL)	

#### 4.4.3.4- Veículo

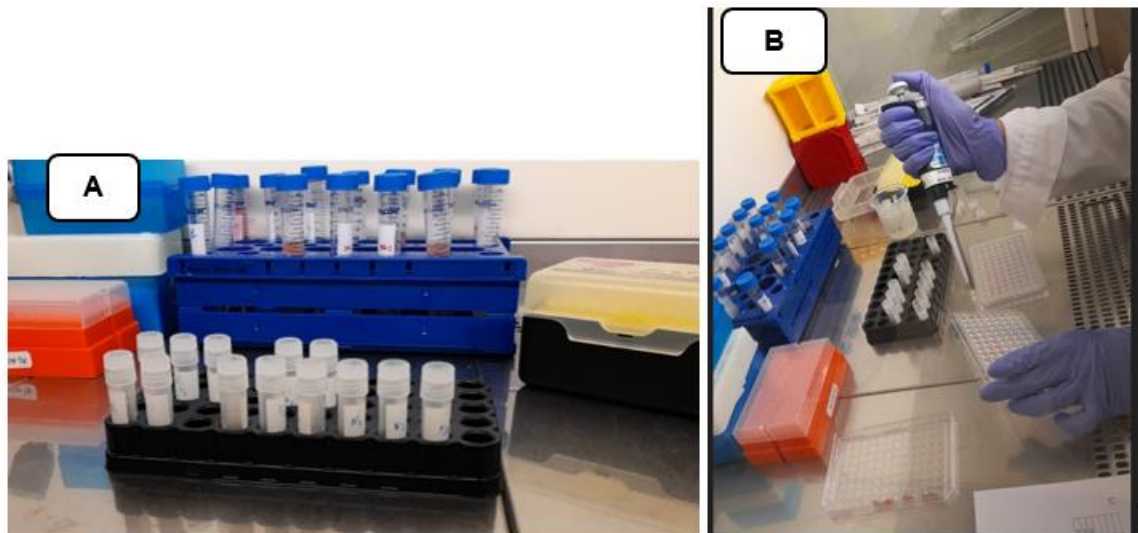
Como referência de veículo usamos o etanol, sendo colocado 10ul de etanol em 990ul meio (1mL), dessa solução retirou-se 10ul para 9990 ul de meio.

#### 4.4.4- Avaliação de Efeitos

Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram cultivadas em placas de 96 poços (100 µL/poço), com uma densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço, e para avaliação de efeitos genotóxicos foram cultivadas em placas de 24 poços (1,5 mL/poço), com uma densidade de  $5,0 \times 10^4$  células/poço.

Como controlos negativos, as células foram cultivadas em meio de cultura padrão e em meio de cultura suplementado com 50 ng/mL de etanol, que corresponde à concentração mais elevada da solução veículo correspondente à concentração presente na exposição de concentração mais elevada de BPA.

As células expostas e os controlos foram incubados em estufas a 37 °C com de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Foram realizadas três réplicas biológicas para cada composto e concentração.

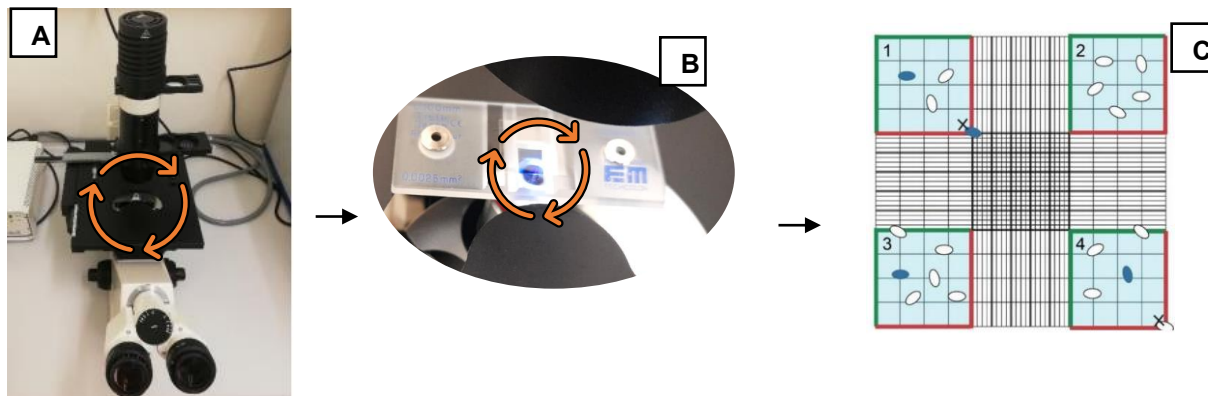


**Figura 4.14:** Preparação da solução química e exposição individual e combinada de PS-NPs e BPA. A: PS-NPs e BPA dissolvidas em concentrações finais de PS-NPs e BPA. B: As exposições individuais e combinadas de PS-NPs e BPA, em placa de 96 poço. **Fonte:** Fotos inéditas

Entretanto, antes da exposição individual e combinada de PS-NPs e BPA, foi estabelecida o número ideal de  $3,2 \times 10^4$  em cada poço da placa de 96 poço, para o ensaio de citotoxicidade. Para isso, quando 90 % de confluência das células foram atingidas, foi feita uma pré-contagem de células em um hemocitômetro (câmara de Neubauer), após a coloração com azul trípiano a 0,4% (fator de diluição = 2). O método de exclusão de Azul de trípiano, baseia-se no princípio em que as células vivas são vistas como células brilhantes, sem tonalidade e com membrana intacta (excluem corante, como azul de trípiano) e células não viáveis (tom azulado). Portanto, é usado para a estimar o número de células viáveis presentes em uma suspensão celular (A. P. Wilson, 2000). Para a contagem, as células foram manipuladas de acordo com o processo de tripsinização descrito anteriormente, de seguida foram retiradas 10  $\mu$ l da suspensão contendo 10  $\mu$ l de azul de trípiano, e incubadas durante 3 minutos máximo e procedeu-se a contagem em uma câmara de Neubauer (**Fig. 4.15B**), previamente limpo com álcool 70 %, no microscópio invertido (**Fig. 4.15A**) com ampliação de 20x. Foram contadas as células viáveis (sem tonalidade), nos quadrantes de 1-4, incluindo as células que se encontraram sob os limites superiores e nas extremas-esquerda dos quadrantes (linha verde), não sendo contadas células nos limites inferiores e as extremas direita destes (linha vermelha) como mostra na **Fig. 4.15C**. Com isso, determinou-se a média de células viáveis, que foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Contagem das células}=(\text{Cell/mL})=\frac{n^{\circ} \text{ de células viáveis em cada quadrante}}{n^{\circ} \text{ de quadrante onde encontraram as células}} \times \text{fator de diluição}$$

(2= 100 L de células + 100 de azul de trípiano)



**Figura 4.15:** Contagem de células viáveis na câmara de Newbauer, no microscópio invertido. **A:** Microscópio Invertido; **B:** Visualização das células na Câmara de Newbauer; **C:** Regras de contagem de células, na câmara de Newbauer. **Fonte:** Foto inédita.

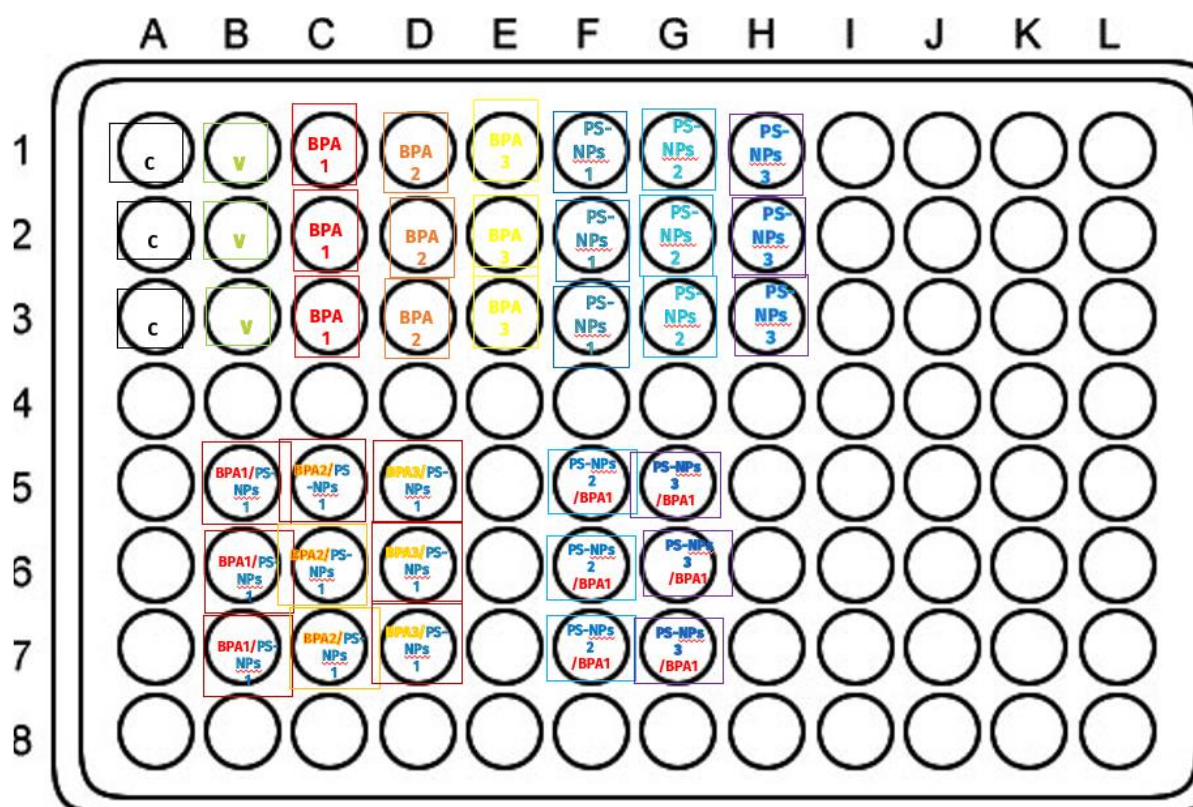
Após estimar o número de células em 1 mL, foi calculado o volume de células a serem colocados cada poço da placa de 96 de forma que cada poço tenha 3000 células em volume de 100 µL.

#### 4.4.4.1- Ensaio de citotoxicidade

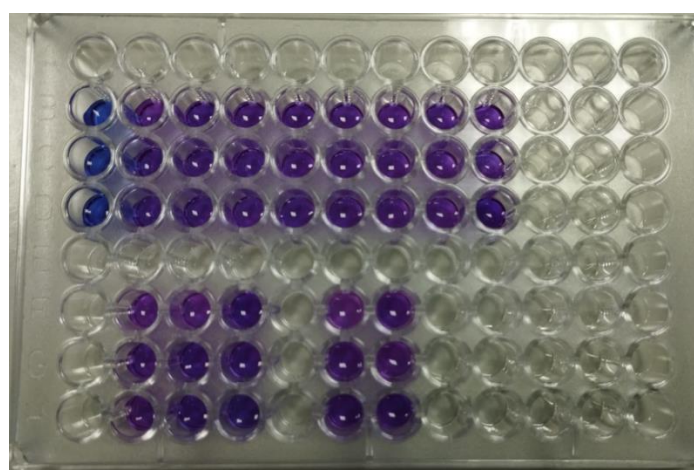
Os efeitos da exposição individual e combinadas de PS-NPs e BPA na viabilidade celular na linha celular gástrica humana GP 202, foi avaliado através de Cell Titer- Blue® Cell Viability Assay (Promega), de acordo com as instruções do fabricante (descrita abaixo). Segundo Helbig Speit (1997) é recomendável, avaliar a viabilidade celular, quando as células têm uma confluência acima de 90% (Hartmann & Speit, 1997).

Para o presente estudo usamos a placa de 96 poços de acordo com a distribuição descrita na **Fig. 4.16**. O meio de cultura padrão e os reagentes foram usados como “meio branco” (controlo).

Após a exposição individual e combinada de BPA e PS-NPs nas concentrações já referidas, foi adicionado a solução de reagente CellTiter-Blue a cada poço de acordo com as instruções do fabricante, sendo as células incubadas por 4 horas e a viabilidade foi determinada através da medição da emissão fluorescente a 590 nm usando um leitor de placas Synergy HT Bio-Tek, conforme mostra a **Fig. 4.17**.



**Figura 4.16:** Mapeamento em placa de 96 poços da exposição individual de BPA: de 1ng/mL (BPA<sub>1</sub>), 0,1ng/mL (BPA<sub>2</sub>) e 0,04ng/mL (BPA<sub>3</sub>), e de PS-NPs: 200 µg/mL (PS-NPs<sub>1</sub>), 100µg/mL (PS-NPs<sub>2</sub>), 20µg/mL (PS-NPs<sub>3</sub>), e exposição combinadas de BPA/PS-NPs: 1µg/mL/200µg/mL (BPA<sub>1</sub>/PS-NPs<sub>1</sub>), 0,1ng/mL/200µg/mL (BPA<sub>2</sub>/PS-NPs<sub>1</sub>), 0,04 ng/mL/200µg/mL (BPA<sub>3</sub>/PS-NPs<sub>1</sub>) e PS-NPs/BPA: 100 µg/mL/1ng/mL (PS-NPs<sub>2</sub>/BPA<sub>1</sub>) e 200 µg/mL/1 ng/mL (PS-NPs<sub>1</sub>/BPA<sub>1</sub>), durante 24 horas para o ensaio da avaliação da viabilidade na linha celular gástricas GP202.



**Figura 4.17:** Placa 96 poços após a exposição individual de BPA: 1ng/mL (BPA<sub>1</sub>), 0,1ng/mL (BPA<sub>2</sub>) e 0,04ng/mL (BPA<sub>3</sub>), e PS-NPs: 200 µg/mL (PS-NPs<sub>1</sub>), 100µg/mL (PS-NPs<sub>2</sub>), 20µg/mL PS-(NPs<sub>3</sub>), e exposição combinadas de BPA/PS-NPs: 1ng/mL/200µg/mL (BPA<sub>1</sub>/PS-NPs<sub>1</sub>), 0,1ng/mL/200µg/mL (BPA<sub>2</sub>/PS-NPs<sub>1</sub>), 0,04 ng/mL/200µg/mL

(BPA<sub>3</sub>/PS-NPs<sub>1</sub>), 100 µg/mL/1ng/mL (NPs<sub>2</sub>/PS-BPA<sub>1</sub>) e 200 µg/mL/1 ng/mL (NPs<sub>1</sub>/BPA<sub>1</sub>), durante 24 horas para o ensaio da avaliação da viabilidade na linha celular gástricas GP202. **Fonte:** Foto inédita

#### 4.4.4.2- Avaliação da genotoxicidade

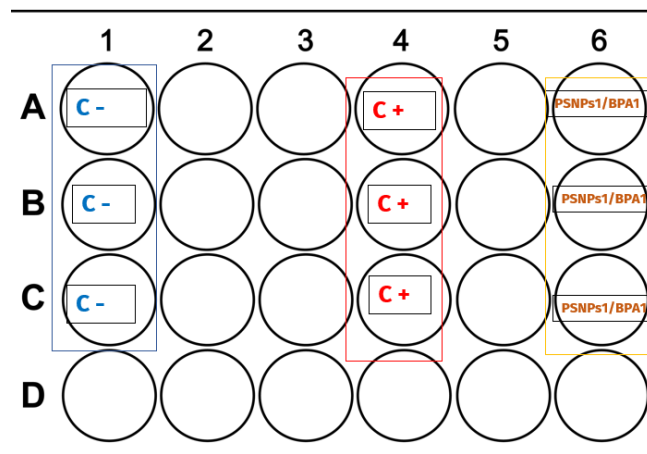
A avaliação da genotoxicidade foi realizada através do Ensaio dos Micronúcleos por Bloqueio de Citocinese (CBMN), segundo *Guideline 487* Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (Aardema et al. 2011) com pequenas modificações do protocolo de (Fenech et al., 2011). O Ensaio dos Micronúcleos por Bloqueio de Citocinese (CBMN), baseia-se no facto do inibidor da polimerização, a citocalasina B (citoB), que ao serem adicionadas antes da mitose resulta em células binucleadas, para tal permite a identificação e análise de micronúcleos apenas nas células que completaram a mitose (Fenech & Morley, 1985b; Kirsch-Volders et al., 2000). Para este estudo as células gástricas GP202, foram semeadas a uma densidade  $4,0 \times 10^4$  células/poço, numa placa de 24 poços (**Fig. 4.18**), com meio completo (FBS 10% e antibióticos) e incubadas na estufa 37°C, CO<sub>2</sub> 5% durante 24 horas. Após a incubação de 24 horas, foram feitas as exposições combinadas nas concentrações mais elevadas (200 µg/mL de PS- NPs + 1 ng/mL de BPA), juntamente com o controle negativo em triplicado e foram incubadas na estufa a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% durante 24 horas.

Foi utilizada como controle positivo, 5 µg/mL de colchicina, de acordo com a OECD *Guideline 487* numa incubação entre 3 a 6h (Aardema et al. 2011). Segundo a OECD *Guideline 487*, as células devem ser expostas ao controlo positivo (colchicina 5µg/mL) numa duração entre 3 a 6h. Desta forma, foi calculado o horário de exposição deste composto de acordo com o término da exposição ao tratamento. Após as 24 horas de exposição, foi removido o meio com o tratamento de todos os poços com pipeta serológica e as células foram lavadas com 1,5 mL (P24) de PBS 2X. De seguida foi adicionado meio novo em cada poço. De seguida foi adicionado em cada poço 6µg/mL de Citocalasina-b, incluindo controlos negativo e positivo, e foram incubadas na estufa 37°C, CO<sub>2</sub> 5% durante 44 horas. Após isso, foi removido o meio de cada poço e foi feito uma lavagem com PBS. Em seguida foi removido o PBS e foi adicionado 350 µL de Tripsina (0,05%) a cada poço e foram incubadas na estufa durante 2 minutos, de seguida foi observado ao microscópio invertido para confirmar se as células já se soltaram. Para as células se soltarem bateu-se cuidadosamente na caixa (ou se for necessário voltar a incubar na estufa por mais 1 minuto). Após as células estarem soltas, foi adicionado igual volume de meio com FBS, de forma a inativar a tripsina. Em seguida foram preparadas previamente as lâminas, e depois foram montadas em citofunil com adição de filtro. Após isso, foi aplicado a totalidade da suspensão celular num citofunil e foi centrifugado a 2000 rpm, durante 5 minutos. De seguida foi desmontado o citofunil e foram retiradas as lâminas. Em seguida foi descartado o filtro e foram deixadas as lâminas a secarem ao ar. Finalmente as

lâminas foram coloradas com a solução Giemsa durante 90 segundos. Depois foram deixados 3 min em ddH<sub>2</sub>O, de seguida as laminas foram deixados a secar completamente antes de montar com recurso a lamela e meio de montagem Entellan®, para serem analisadas no microscópico (**Fig. 4.19**). As análises as células foram processadas e analisadas de acordo com as *Guideline 487 OCDE* (Aardema et al. 2011) e identificadas de acordo com a presença de MN, NPB ou NBUD, calculando a sua frequência relativa ao número de células total. Foram repetidos três vezes com pelo menos três repetições por tratamento.

Para cada condição experimental, foi calculado o índice de proliferação de bloqueio de citocinese (CBPI) com base na frequência de células mononucleares, binucleadas e multinucleadas, usando a seguinte fórmula:

$$\text{CBPI} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ total de células mononucleadas}) + (2 \times \text{n}^\circ \text{ de células binucleadas}) + (3 \times \text{n}^\circ \text{ de células multinucleadas})}{\text{n}^\circ \text{ totais de células}}$$



**Figura 4.18:** placa 24 poço com a exposição combinada de 1 ng/mL de BPA e 200 µg/mL de PS-NPs1 nas gástricas humanas GP202 para ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN).



**Figura 4.19:** lâminas coloradas com a solução Giemsa para ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN). **Fonte:** Foto Inédita.

#### **4.5- Tratamento estatístico**

Os valores obtidos nos diferentes ensaios de exposição foram de acordo com a condição em grupos de réplicas, calculando assim a média e o erro-padrão para realizar análise estatística. No caso dos ensaios de citotoxicidade, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o tratamento controlo e a condição de veículo para BPA (etanol) foram avaliadas através da utilização de um teste T de Student. Posteriormente os conjuntos de tratamentos por BPA ou PS-NPs foram avaliados através de um estudo de normalidade e uma análise de variância unilateral ou de duas vias no caso de exposições combinadas para avaliar se existiam diferenças significativas.

Para o estudo de genotoxicidade, avaliaram-se diferenças significativas em cada um dos parâmetros (frequência de MN, NPBs e NBUDs e o CBPI) relativamente ao controlo negativo (sem qualquer tratamento) e ao controlo positivo com colchicina através de um estudo de normalidade e uma análise de variância unilateral.

E os dados foram correlacionados com os efeitos citotóxicos observados através da avaliação da viabilidade.

#### **4.6- Considerações éticas e legais**

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética da ESTeSL e tem a seguinte referência interna IDI&CA-IPL\_CE-ESTeSL-Nº.09-2021.

## 5- Resultados

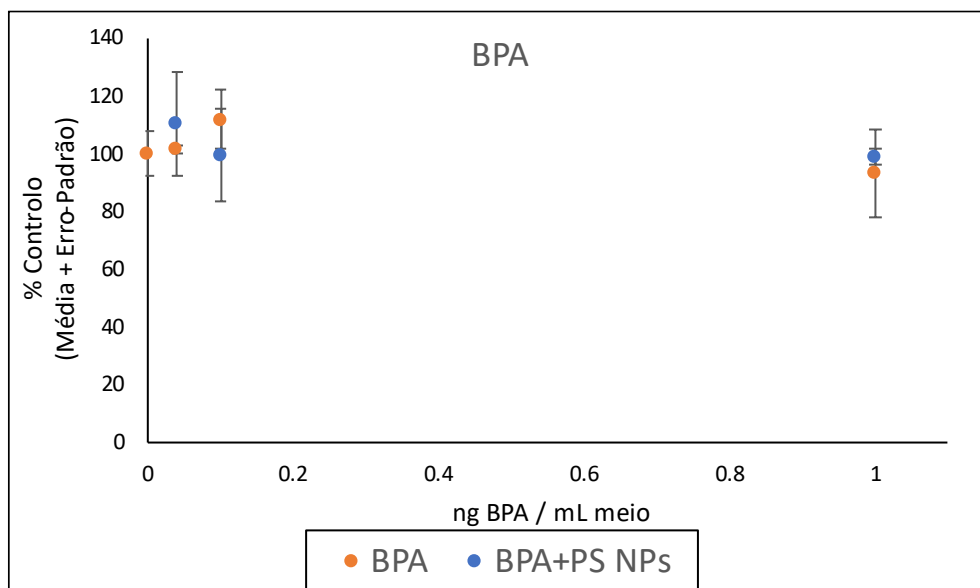
### 5.1- Citotoxicidade

Os potenciais efeitos citotóxicos da exposição individual e combinada das PS-NPs e do BPA, na linha celular gástrica GP202 foram avaliados analisando a viabilidade celular, através do ensaio CellTiter-Blue. Foram testadas as três concentrações de BPA ambientalmente relevantes e baseada na literatura: 1, 0,1 e 0,04 ng/mL, e as 3 concentrações de PS-NPs: 20, 100 e 200 µg/mL separadamente e combinadas, como apresentadas as **Tabela 4.4, 4.5 e 4.6**.

#### 5.1.1- BPA

Relativamente ao BPA, os nossos resultados mostraram que a exposição individual BPA, não afetou a viabilidade celular. Não se observaram diferenças significativas entre os valores de viabilidade nas condições controlo e veículo.

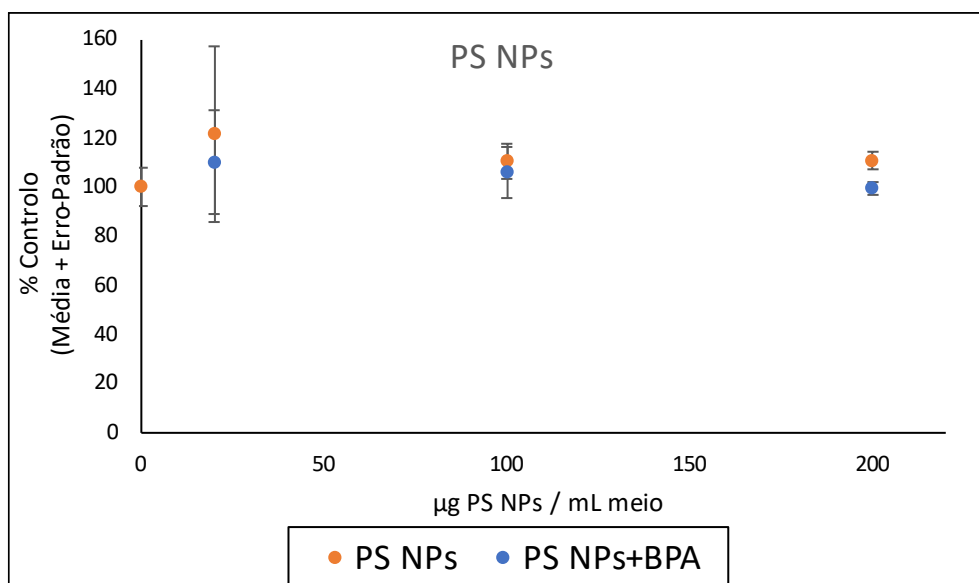
No caso de combinação de exposição de diferentes concentrações de BPA com uma concentração de PS-NPs (200 µg/mL) também não se verificaram diferenças comparativamente ao controlo nem relativamente à correspondente concentração de exposição individual (**Fig. 5. 20**).



**Figura 5.20:** Avaliação dos efeitos da viabilidade celular na linha celular GP202, após 24 h de exposição individual a BPA nas concentrações de 0,04, 0,1 e 1 ng/mL e combinadas com 200 µg/mL de PS-NPs. Os resultados foram apresentados como percentagem do número de células viáveis na condição controlo, sem adição de BPA ou veículo. Foram feitas 3 réplicas biológicas e os resultados apresentados como média e o erro padrão das 3 replicas.

## 5.1.2- PS-NPs

Quanto as PS-NPs, os nossos resultados mostraram que não foi possível observar nenhuma diferença significativa, inclusive nas concentrações mais elevadas de PS-NPs (200µg/mL). O mesmo se observou nas exposições combinadas (**Fig. 5.21**)

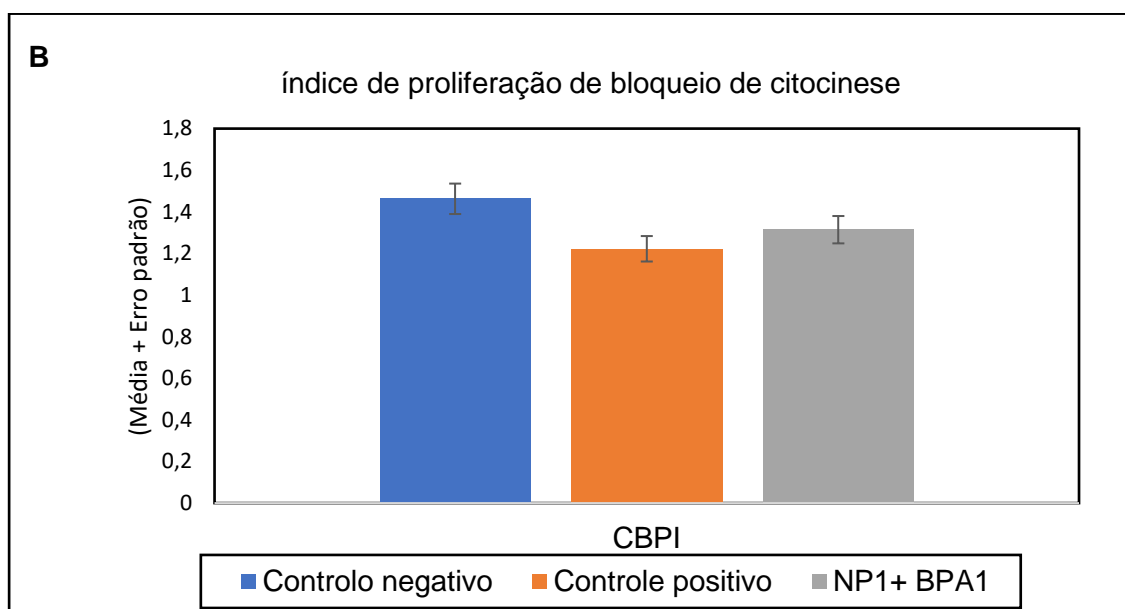
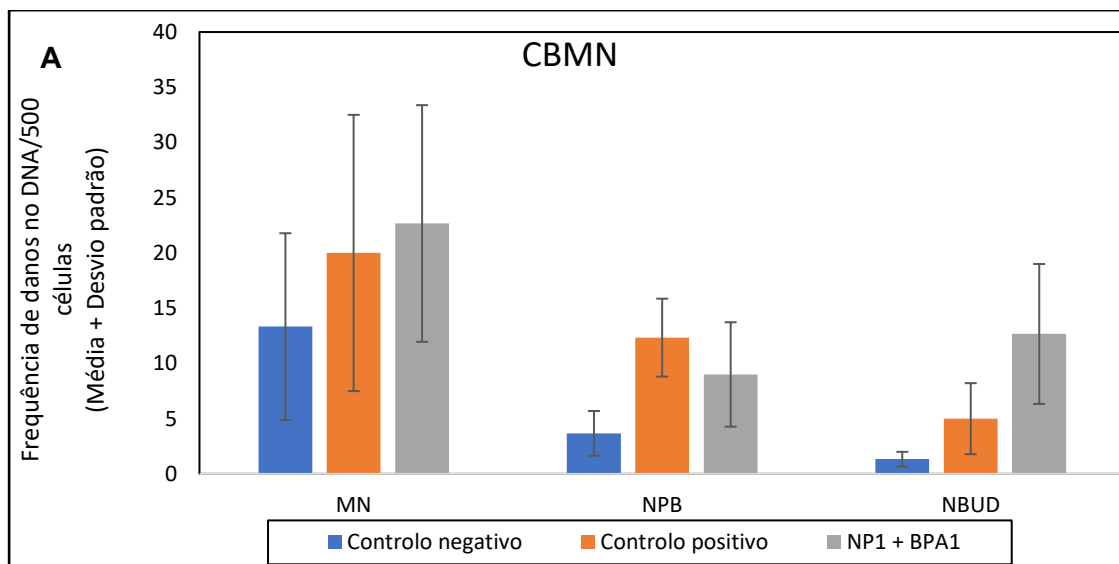


**Figura 5.21:** Avaliação dos efeitos da viabilidade celular na linha celular GP202, após 24 h de exposição individual de PS-NPs nas concentrações 20,100 e 200 µg/mL e combinadas com 1ng/mL de BPA. Os resultados foram apresentados como percentagem do número de células viáveis na condição controle, sem adição de PS-NPs. Foram feitas 3 réplicas biológicas e os resultados apresentados como média e o desvio padrão das 3 replicas.

## 5.2- Genotoxicidade

### 5.2.1- Exposição combinada de PS-NPs e BPA

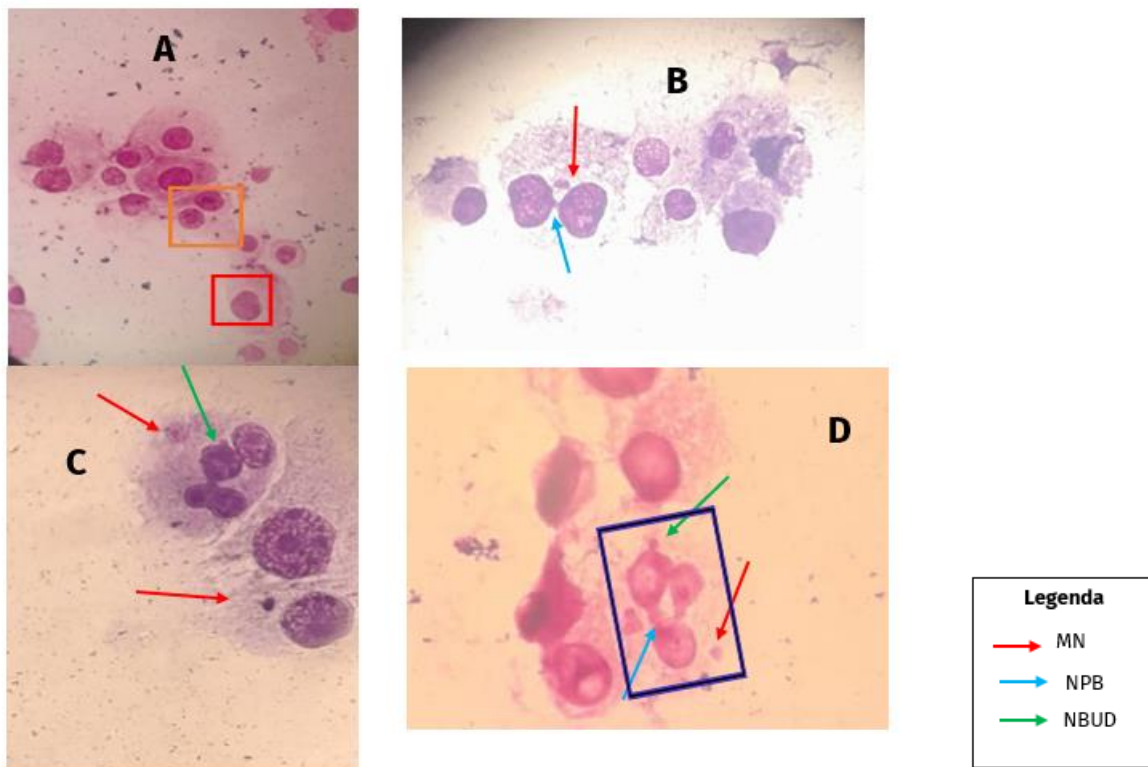
O efeito da exposição combinadas nas concentrações mais elevadas (200 µg/mL de PS-NPs e 1 ng/mL de BPA), durante 24 horas, nas células gástricas, esta ilustrada na **Fig. 5.22 e Fig. 5.23**. Para cada ensaio foi calculado, o índice de proliferação de bloqueio de citocinese (CBPI) para determinar a frequência de células mononucleares, binucleadas e multinucleadas e para cada experimento avaliamos as células totais e os biomarcadores de danos de DNA, nomeadamente os MN, NPBs e NBUDs. Observamos uma tendência de aumento em todos os parâmetros avaliados ( $22.9 \pm 6.19$ ,  $8.8 \pm 2.69$  e  $12.4 \pm 3.56$ ) em comparação com o controle negativo ( $13.2 \pm 4.81$ ,  $3.7 \pm 1.12$  e  $1.5 \pm 0.42$ ), aproximando-se dos valores do controle positivo no caso de MN e NBUD ( $20.2 \pm 7.29$  e  $10,1 \pm 4.78$ ) (**Fig. 5.22 A**). Relativamente ao índice de proliferação de bloqueio de citocinese (CBPI), teve uma diminuição comparada ao nosso controle negativo (**Fig. 5.22 B**).



**Figura 5.22:** Avaliação dos efeitos da genotoxicidade na linha celular GP202, através do ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN), após 24 h de exposição combinada de 200 µg/mL de PS-NPs e 1 ng/mL de BPA ( $p < 0,05$ ). **A:** Avaliação do MN, MN, NPBs e NBUDs em 500 células binucleadas observadas; **B:** Índice de Proliferação de Blocos de Citocinese (CBPI). Foram feitas 3 réplicas biológicas e os resultados obtidos apresentados como a média e o erro padrão.

Na **Fig. 5.23**, podemos ver os biomarcadores da genotoxicidade, nomeadamente danos no DNA na linha celular GP202, após 24 h de exposição combinada de 200 µg/mL de PS-NPs e 1 ng/mL de BPA, mais concretamente a ocorrência de MN (**setas vermelhas**), NPB (**setas**

azuis) e NBUD (seta verde) e células mononucleares (quadrado vermelho), binucleares (quadrado laranja) e multinucleares (retângulo azul).



**Figura 5.23:** Danos no DNA na linha celular GP202, avaliada através do ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN), após 24 h de exposição combinada de 200 µg/mL de PS-NPs e 1 ng/mL de BPA; **A:** Controle negativo (-), Células mono e binucleada; **B:** Células expostas a PS-NPs + BPA, Células Binucleada com Micronúcleo (MN) e Pontes Nucleoplasmáticas (NPB); e **C** Células expostas a PS-NPs + BPA, células binucleadas com MN e células multinucleada com MN; **D:** controle positivo (+), Células multinucleada com protusões nucleares (NBUD) e MN. Fotos Inéditas

## 6- Discussão

Devido as diversas vias e fontes de exposição dos PS-NPs e BPA, existe o alerta quanto aos riscos para a saúde humana (Vandenberg et al. 2007, 2010). Embora nos últimos anos as PS-NPs e o BPA foram focos de vários estudos, inclusive o BPA foi testado em tecidos e células cancerígenas responsivas ao estrogênio (Ramos et al., 2019), entretanto, dados sobre os potenciais efeitos da exposição combinada de NPs e BPA são insuficientes (Zheng et al., 2023), além disso, os efeitos tóxicos de NPs em humanos ainda são desconhecidos (Duis & Coors, 2016; Sangkham et al., 2022).

Portanto, este estudo experimental pretendeu avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos da exposição individual e combinada de PS-NPs e BPA, nas células gástricas humanas GP202, em concentrações ambientais, semelhantes a concentrações testadas em estudos anteriores (Ramos et al., 2019). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a investigar a exposição individual e combinada de PS-NPs e BPA, in vitro com células gástricas humanas GP202.

As concentrações de BPA usadas foram encontradas em fluidos biológicos, segundo estudos de biomonitorização, usando o valor de referência proposta recentemente pela EFESA 2021 (Deepika et al., 2022). Quanto as concentrações de PS-NPs, segundo estudos anteriores concentrações menor que 100 µg/mL de PS-NPs não afetaram a viabilidade celular (Shi et al., 2021), desse modo assegurando uma diversidade de respostas, tanto a concentrações baixas (20 µg/mL) como mais altas.

Relativamente aos resultados obtidos após a exposição durante 24 horas era esperado que houvesse uma alteração significativa da viabilidade celular, na concentração mais elevada de PS-NPs, tal como na exposição combinada de PS-NPs e BPA, Dada que estudos recentes sugerem que, a exposição de Ps-NPs e BPA, nas concentrações mais elevadas provocam aumento de ROS, estresse oxidativo, resultante em danos nas células e morte celular. (E. H. Kim et al., 2022)

### 6.1. Viabilidade celular após exposição a PS-NPs

Ainda que no presente estudo, se tenha observado um aumento nas concentrações de 200 µg/mL de PS-NPs e um uma pequena alteração na exposição combinada de 200 µg/mL de PS-NPs e 0,04 ng/mL de BPA, essas alterações na viabilidade celular não foram significativas, comparadas ao controle. Assim, tanto a exposição individual como a combinada de PS-NPs e BPA não afetou a viabilidade na linha celular gástrica humana GP202.

Semelhante aos nossos resultados, Domenech, et al., fez a exposição de PS-NPs (tamanho 40-90 nm) durante 24 horas usando concentrações até 200 µg/mL, nas células intestinais diferenciadas Caco-2/HT29 e células Caco-2/HT29 + Raji-B, simulando a barreira intestinal humana e seu sistema linfóide associado, não tendo observado efeitos citotóxicos significativos em nenhum dos sistemas analisados (Domenech et al. 2020). Também Vecchiote, et al, avaliou a exposição de a PS-NPs nas células de carcinoma colorretal humano - HCT116, só observou alteração significativas em concentrações de PS-NPs superiores às usadas neste estudo (800 µg/mL e 1200 µg/mL) (Vecchiotti et al., 2021).

Os resultados obtidos foram também de encontro ao trabalho por Banerjee e Shelver, que investigaram a viabilidade celular na linha celular gástricas humanas, com diferente tamanhos de PS, não observando nenhuma alteração significativa na exposição de PS-NPs (tamanho 110nm) (Banerjee, Billey, and Shelver 2021).

No entanto, Q. Wang et al., investigou a toxicidade de PS-MPs em tamanho micro e nano antes e depois da absorção de BPA, na linha celular caco-2 de cancro de colón humana, relatando que microplásticos em nanoescala (tamanho 300 nm, 500 nm) devido à sua grande área superficial específica de adsorção de BPA, provocou maior efeitos de citotoxicidade comparada ao microplásticos em microescala (1 µm, 3 µm, 6 µm), associado a alteração na espécies reativas de oxigénio, aumento do estresse oxidativo resultante na disfunção mitocôndrias e (Q. Wang et al., 2020).

## **6.2. Viabilidade celular após exposição a BPA**

Em consonância com os resultados obtidos, há alguns estudos disponíveis em que se demonstraram que baixas concentrações de BPA (Pfeifer et al., 2015; Welshons et al., 2006) não afetam a viabilidade celular. Em consonância com esses achados, Ramos et al. utilizou concentrações de BPA semelhantes às usadas neste estudo para avaliar a resposta em células epiteliais- Hep-2 e fibroblastos pulmonares - MRC-5, demonstrou que a exposição individual do BPA, não afetou a viabilidade em nenhuma das células expostas. Por outro lado, foi demonstrado que exposição de BPA, nas concentrações ambientais (1-10 µM), nas células-tronco derivadas do tecido adiposo de ratos adultas (rASCs) e células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), induziu efeitos citotóxicos nas concentrações de (1 e 10 µM) (Harnett et al., 2021). Assim como também, a exposição de BPA nas concentrações de 50–300 µM nas células calciformes intestinais humanas - LS174T, provocou alteração na viabilidade celular, disfunção mitocondrial, associado ao aumento de ROS , estresse oxidativo e induziu apoptose intestinal (Zhao et al., 2019).

### 6.3. Viabilidade celular após exposição combinada

Relativamente alteração na viabilidade nas exposições combinadas, sabe-se que as PS-NPs, devido ao seu tamanho pequeno e a sua grande área superficial, tem a capacidade de adsorver e modificar as propriedades físico-químicas dos poluentes absorvidos (Gallo et al., 2020; Sørensen et al., 2020). Por outro lado, temos o BPA com seus diferentes mecanismo de ações e a sua capacidade em ligar a diversos recetores hormonais (Ribeiro et al., 2017), seria expectável que a sua combinação provocasse um efeito significativamente maior, especialmente na maior concentração de PS-NPs e BPA. Tendo em conta, que escolhemos a maior concentração de PS-NPs (200 µg/mL), baseados nos estudos da Shi, et al, que relatou maior alteração na viabilidade celular, resultante na exposição individual e combinada de PS-NPs e PAEs nas células epiteliais pulmonares – A549 nas concentrações mais elevadas concertações ( 200 µg/mL) (Shi et al., 2021). Contraria os resultados da Shi, et al, nos nossos resultados, não foram observadas alterações na viabilidade celular resultante da exposição combinadas de PS-NPs e BPA. Portanto, os efeitos da exposição combinada de PS-NPs e BPA na viabilidade celular pode ser dependente do tipo de células, do tipo de contaminantes usado para a exposição combinada (Gao et al., 2023).

Cheng et al., que utilizou concentrações, superiores aos nossos estudos, simulando as concentrações internas de BPA e PS-MPs (1 µm), nas concentrações de 1000, 100, 10 e 0 ng/mL de BPA e 500, 250 e 50 ng/mL de PS-NPs, para avaliar as funções hepáticas e metabólicas, nos organoides hepáticos humanos, demonstrando alteração na viabilidade celular, resultante nos efeitos hepatóxicos (Cheng et al., 2023). Corroborando com estudos anteriores que sugeriram que concentrações elevadas de PS-NPs e BPA, provocam maior efeitos na citotoxicidade (Pfeifer et al., 2015; Vecchiotti et al., 2021; Welshons et al., 2006).

Em outros estudos de combinação destas substâncias, Ramos, et, al., investigou os efeitos de BPA e sua interação com quimioterápicos (DOX) em MRC-5, observando que a exposição individual de BPA, não afetou a viabilidade, mas na exposição combinada de BPA e DOX afetou a viabilidade (Ramos et al., 2019).

A par disso, existe um deficit de estudos sobre a exposição combinada de PS-NPs com outros poluentes ambientais, especialmente o BPA, em modelos *in vitro*.

### 6.4. Genotoxicidade após exposição combinada

Relativamente a genotoxicidade, escolhemos apenas a exposição combinada nas concentrações mais elevadas de 200 µg/mL de PS-NPs e 1 ng/mL de BPA, para avaliarmos os danos de DNA nas células gástricas, durante 24 horas, de modo a assegurar algum tipo de resposta ainda que sub-letal. O ensaio de genotoxicidade *in vitro*, é considerada uma da

ferramenta essencial para a avaliar a instabilidade genômica, dos agentes químicos (Fenech et al., 2011). Sabe-se, que as NPs por serem tão pequenas conseguem atravessar a membrana plasmática, entrar no núcleo da célula, desencadeando inúmeras respostas celulares como a produção de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, ações inflamatórias, sinalização celular incorreta (Hesler et al., 2019), resultante em danos no DNA, (Nickens et al., 2010; Vecchiotti et al., 2021). Tal como esperávamos, observou-se que a exposição combinada de 200 µg/mL de PS-NPs e 1 ng/mL de BPA, induziu danos no DNA, em todos os parâmetros investigados, nomeadamente MN, NPB, NBUD, comparada ao controlo. Apesar de existir um défice de estudos sobre os efeitos na genotoxicidade e na exposição combinadas de poluentes (da Costa Araújo et al., 2022), nossos resultados são semelhantes a alguns estudos. Ramos et al, usou concentrações de BPA para investigar a sua interação com DOX ambientais, semelhantes a este estudo, demonstrou, danos de DNA na exposição combinada de BPA e DOX nas células Hep-2 nas concentrações de 1 µg/mL e 0,1 ng e nas células MRC-5 nas concentrações de 1 µg/mL 0,1 ng/mL (Ramos et al., 2019). Um estudo recente, investigou a à exposição de PE-MPs em uma mistura de poluente, observaram um aumento da indução de MN, em peixes zebrafish (da Costa Araújo et al., 2022).

Entretanto, existe vários estudos, que evidenciaram efeitos genotóxicos individuais de PS-NPs e BPA (Poma et al., 2019; X. Shi et al., 2022; Vecchiotti et al., 2021; Y. Wang et al., 2018), todavia, informações na literatura disponíveis dos efeitos genotóxicos da exposição combinada de PS-NPs e BPA, são escassos (Gao et al., 2023) e dos poucos que existem são nos modelos *in vivo*, associados aos efeitos histopatológicas nos organismos (Yu et al., 2023; Zheng et al., 2023). Por outro lado, PS-NPs (tamanho 100 nm), induziu aumento de frequência de MN, nas concentrações de 25 e 75 µg/mL e aumento da formação NBUD nas concentrações de 5 e 75 µg/mL (Poma et al., 2019). Em corroboração com esses resultados, a exposição de PS-NPs (80 nm), nas concentração mais elevadas (100 µg/mL), teve maior aumento de frequência de MN, nas células epiteliais pulmonar humanas A549 (X. Shi et al., 2022).

## 6.5. Mecanismos de Toxicidade

Correlacionando os efeitos da citotoxicidade dos efeitos da genotoxicidade, relativamente ao BPA, observamos que em concentrações ambientais de PS-NPs e BPA, nas células gástricas GP 202, não afetou a viabilidade celular, mas induziu danos no DNA. Em corroboração com esses dados, estudos anteriores, sugeriram que alta concentração de BPA podem induzir efeitos citotóxicos aguda, e concentrações baixas (ambientais) de BPA, podem não induziram

efeitos na viabilidade celular, mas pode ser o suficiente para provocar danos no DNA (Ramos et al., 2019). Em consonância com isso, estudos anteriores também demonstraram que baixas concentrações de BPA não afetam a citotoxicidade, contudo, o BPA devido aos seus vários mecanismos de ação, consegue interagir com DNA celular e induzir danos no DNA (Pfeifer et al., 2015; Welshons et al., 2006). Quanto as NPs, podem influenciar diretamente o material genético, dada a sua capacidade de entrar no núcleo da célula e interagir com o DNA, resultante na indução de danos no DNA (N. Singh et al., 2009). Portanto, os danos na genotoxicidade podem ser desencadeados por diversos mecanismos, como por exemplo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), estresse oxidativo, ação inflamatória e sinalização incorreta (Hesler et al., 2019). Além disso, existem evidências, que formas, tamanho, superfície, concentrações e tempo de exposição podem influenciar a produção de ROS (Jeong et al., 2017; Paul-Pont et al., 2016). Em corroboração com isso, Vecchiotti, et al., investigou a cito-genotoxicidade, através da exposição de PS-NPs (tamanho 100 nm) nas concentrações de 400, 800 e 1200 µg/mL, nas células de carcinoma colorretal humano (HCT116), não relataram alteração na viabilidade celular nas concentrações inferior a 800 µg/mL, no entanto observou alterações significativas nas concentrações 800 e 1200 µg/mL, na viabilidade celular e danos no DNA, especificamente um aumento significativo na frequência de MN e NBUD, relativamente ao controle, (Vecchiotti et al., 2021). Sugerindo que, altas concentrações de PS-NPs, contribuíram para alteração na viabilidade (Vecchiotti et al., 2021). Contudo, existe evidências da alteração de viabilidade celular nas concentrações mais baixas de PS-NPs. Poma, et al, observou alteração na viabilidade celular, nas células Hs27 nas concentrações de 75 µg/mL de PS-NPs (Poma et al., 2019). Assim, como, Shi et al usou concentração semelhantes ao nossos e observou alteração na viabilidade celular e na genotoxicidade nas células A549, tanto na exposição individual como combinada de 200 µg/mL de PS-NPs e PAEs (Shi et al., 2021). Portanto, o efeito não observados na citotoxicidade, nesse estudo pode não estar associados as concentrações, dada que usamos concentrações e tamanhos de PS-NPs (100 nm) e BPA, que já foram observadas alterações em estudos anteriores (Poma et al., 2019; Ramos et al., 2019; Q. Shi et al., 2021). Mas sim, sugerimos que seja, as próprias células gástricas, que podem ter diferentes fenótipos que secretam diferentes tipos de moléculas e enzimas que podem interagir com os as PS-NPs e BPA, influenciado a viabilidade celular. Segundo a literatura as células, têm diversos mecanismos de defesa para escapar dos efeitos do ROS, através de ativação de moléculas e sistemas antioxidante enzimático com funções desintoxicadores como (cobre-zinco (SOD1) e manganês (SOD2) superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (GPx) (Vecchiotti et al., 2021). Além disso, as células gástricas GP 202, por serem imortais podem ter proliferação mais ativa, logo não serão tão responsivas ao estímulo (Gärtner et al., 1996).

Relativamente os efeitos da genotoxicidade da exposição combinada de PS-NPs, com BPA, ainda é muito limitado e os poucos disponíveis são nos modelos *in vivo*. Estudos recentes, sugeriram que os mecanismos associados aos danos no DNA, nomeadamente aumento na frequência de MN, esta associado a formação de radicais livres que interferem na integridade do DNA, nos mecanismos de reparo resultante e bloqueio da citocinese (da Costa Araújo et al., 2020, 2022). Além disso, os biomarcadores genotóxicos, nomeadamente MN, NPB, e NBUD, estão associados a quebra, ou perda de cromossomas, mau reparo ou fusão final de telómeros, sugerindo que por poluentes podem induzir falhas no reparo do DNA ou inativação de mecanismos essenciais necessários para a remoção de complexos de reparo incorreto e eliminação de complexos DNA-proteína na reparação de DNA (de Campos Ventura et al., 2008)

### **Limitações**

Todavia, neste estudo experimental, tivemos algumas limitações, devido as dificuldades na manutenção e propagação das culturas celulares que atrasou e limitou bastante este estudo principalmente no número de células disponíveis para avaliar genotoxicidade, que nos levaram a considerarmos 500 células binucleadas em vez de 1000 células binucleadas, segundo *Guideline 487* da OCDE (Aardema et al. 2011). Além disso, seria importante testar, tanto a exposição combinada, como individual de forma a comparar se os potenciais efeitos genotóxicos foi dependente das concentrações de PS-NPs, ou não.

Mais de que estudos futuros é preciso otimizar esse método e investigar a genotoxicidade na exposição individual com esses poluentes de forma a correlacionar os efeitos da exposição individual e combinada de PS-NPs e BPA, na genotoxicidade. De forma a estimar uma média para a concentração ambiental com efeitos na saúde humana, dada que até ao momento não existe controle de limite de concentrações ambientais de NPs (Vecchiotti et al., 2021), principalmente em cenários de misturas (Ribeiro et al., 2017).

Além disso, as células gástricas por ter um ambiente natural específico, sugerimos estudos futuros com essas células envolvidas com os sucos gástricos, de forma a imitar o seu ambiente natural.

## 7- Conclusão

A contaminação de PS-NPs e do BPA, é global afeta todos as fontes da cadeia alimentar humana, através dos produtos alimentares de uso diário, incluindo, águas, frutas, legumes, produtos de supermercado ou por cadeia tróficas. Além disso, estudos de biomonitorização confirmaram a presença de PS-NPs e BPA, nos fluidos biológicos incluindo, sangue, urina, saliva, leite materno, placenta e líquido amniótico, dando por isso razão para levar a cabo diversos estudos *in vivos* e *in vitro* como apresentados ao longo deste trabalho.

Nesse estudo, procuraram estudar-se os efeitos citotóxicos e genotóxicos de PS-NPs e BPA, na linha celular gástrica humana GP202. Ao contrário do expectável, não se observou efeitos a nível da viabilidade celular em qualquer condição de exposição. No entanto, observaram-se respostas a nível de biomarcadores de dano de na exposição combinada de 200 µg/mL de PS-NPs + 1 ng/mL de BPA, sugerindo a ocorrência de efeitos sub-letais que poderão a longo prazo acumular e causar morte celular. Realçamos a necessidade de estudar os mecanismos de combinação de substâncias para entender de que forma estas exposições combinadas geram danos no sistema biológico.

Este estudo demonstra o risco da exposição combinada de PS-NPs e BPA na saúde humana, nomeadamente no sistema gástrico, e, portanto, justificando um maior rigor a nível da segurança alimentar. Para tal, é importante desenvolver mais estudos enfocados em exposições combinadas de NPs e plastificantes de forma a compreender melhor os seus efeitos. Isto permitirá a construção de bancos de dados que permitam desenvolver, realizar e avaliar a segurança dos riscos de misturas químicas, dando também às entidades competentes suporte científico para controlar e regular a produção desses produtos químicos, especialmente em produtos de consumo diário.

## 8- Referências bibliográficas

- Aardema, Marilyn J. et al. 2011. "Guidance for Understanding Solubility as a Limiting Factor for Selecting the Upper Test Concentration in the OECD In Vitro Micronucleus Assay Test Guideline No. 487." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 722(1): 89–90.
- Albert A. Koelmans, E. B. (2015). Nanoplastics in the Aquatic Environment. Em M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Ed.), *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 335-350). Wageningen, The Netherlands: Springer. doi:10.1007/978-3-319-16510-3\_12
- Anderson, Julie C., Bradley J. Park, and Vince P. Palace. 2016. "Microplastics in Aquatic Environments: Implications for Canadian Ecosystems." *Environmental Pollution* 218: 269–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.074>.
- Andrady, Anthony L., and Mike A. Neal. 2009. "Applications and Societal Benefits of Plastics." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 1977–84.
- Abo-Elsoud, R. A. E. A., Ahmed Mohamed Abdelaziz, S., Attia Abd Eldaim, M., & Hazzaa, S. M. (2022). Moringa oleifera alcoholic extract protected stomach from bisphenol A–induced gastric ulcer in rats via its anti-oxidant and anti-inflammatory activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(45), 68830–68841. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20543-0>
- Abou Omar, T. F., Sukhn, C., Fares, S. A., Abiad, M. G., Habib, R. R., & Dhaini, H. R. (2017).

Bisphenol A exposure assessment from olive oil consumption. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(7). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6048-6>

Agudo, A., Cayssials, V., Bonet, C., Tjønneland, A., Overvad, K., Boutron-Ruault, M. C., Affret, A., Fagherazzi, G., Katzke, V., Schübel, R., Trichopoulou, A., Karakatsani, A., La Vecchia, C., Palli, D., Grioni, S., Tumino, R., Ricceri, F., Panico, S., Bueno-De-Mesquita, B., ... Jakszyn, P. (2018). Inflammatory potential of the diet and risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 107(4), 607–616. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy002>

Allen, S., Allen, D., Phoenix, V. R., Le Roux, G., Durántez Jiménez, P., Simonneau, A., Binet, S., & Galop, D. (2019). Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nature Geoscience*, 12(5), 339–344. <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0335-5>

Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., & Nadal, A. (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental Health Perspectives*, 118(9), 1243–1250.

Andrady, A. L. (2011). *Microplastics in the marine environment*. *Mar Pollute Bull* 62 (8): 1596–1605.

ASAE. (2011). *Autoridade de segurança alimentar e económica*. Obtido em 01 de 08 de 2023, de ASAE: <https://www.asae.gov.pt/cooperacao/internacional/multilateral1/efsa/noticias/parecere>

s-cientificos-/a-comissao-europeia-congratula-se-pela-proibicao-do-uso-de-bpa-nos-biberons-pelos-estados-membros-da-ue.aspx

Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., D'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., & Regoli, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>

Baeza-Martínez, C., Olmos, S., González-Pleiter, M., López-Castellanos, J., García-Pachón, E., Masiá-Canuto, M., Hernández-Blasco, L., & Bayo, J. (2022). First evidence of microplastics isolated in European citizens' lower airway. *Journal of Hazardous Materials*, 438(April). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129439>

Banerjee, A., Billey, L. O., & Shelver, W. L. (2021). Uptake and toxicity of polystyrene micro/nanoplastics in gastric cells: Effects of particle size and surface functionalization. *PLOS ONE*, 16(12), e0260803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260803>

Banerjee, A., & Shelver, W. L. (2021). Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review. *Science of The Total Environment*, 755, 142518. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.142518>

Bank, M. S., & Hansson, S. V. (2019). The Plastic Cycle: A Novel and Holistic Paradigm for the Anthropocene. *Environmental Science and Technology*, 53(13), 7177–7179. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02942>

Barnes, David K.A., Francois Galgani, Richard C. Thompson, and Morton Barlaz. 2009. "Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments."

*Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 1985–98.

Barreto, A., Santos, J., Almeida, L., Tavares, V., Pinto, E., Celeiro, M., Garcia-Jares, C., & Maria, V. L. (2023). First approach to assess the effects of nanoplastics on the soil species *Folsomia candida*: A mixture design with bisphenol A and diphenhydramine. *NanoImpact*, 29(December 2022), 100450. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2023.100450>

Beausoleil, C., Beronius, A., Bodin, L., Bokkers, B. G. H., Boon, P. E., Burger, M., Cao, Y., De Wit, L., Fischer, A., Hanberg, A., Leander, K., Litens-Karlsson, S., Rousselle, C., Slob, W., Varret, C., Wolterink, G., & Zilliacus, J. (2017). Review of non-monotonic dose-responses of substances for human risk assessment. *EFSA Supporting Publications*, 13(5). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.en-1027>

Belshe, K., Horton, M., & Duncan, J. (2008). Understanding Toxic Substances An Introduction to Chemical Hazards in the Workplace. *Department of Public Health*, 1, 44. <https://www.cdph.ca.gov/programs/hesis/Documents/introtoxsubstances.pdf>

Bergmann, M., Gutow, L., & Klages, M. (2015). Marine anthropogenic litter. In *Marine Anthropogenic Litter*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>

Bernardo, P. E. M., Navas, S. A., Murata, L. T. F., & de ALCÂNTARA, M. R. da S. (2015). Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade—Uma Revisão. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 74(1), 1–11.

Bi, X., Simoneit, B. R. T., Wang, Z. Z., Wang, X., Sheng, G., & Fu, J. (2010). The major components of particles emitted during recycling of waste printed circuit boards in a

typical e-waste workshop of South China. *Atmospheric Environment*, 44(35), 4440–4445.

<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.07.040>

Blackburn, K. (2022). The potential effects of microplastics on human health : What is known and what is unknown. *Ambio*, 51(3), 518–530. <https://doi.org/10.1007/s13280-021-01589-9>

Bolli, A., Bulzomi, P., Galluzzo, P., Acconcia, F., & Marino, M. (2010). Bisphenol a impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB Life*, 62(9), 684–687. <https://doi.org/10.1002/iub.370>

Boucher, J. G., Boudreau, A., Ahmed, S., & Atlas, E. (2015). in Human and Murine Preadipocytes. *Environ Health Perspect*, 123(12), 1287–1293.

Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. El, Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K., Stewart, B. W., Smet, S. D., Corpet, D., Meurillon, M., Caderni, G., Rohrmann, S., Verger, P., Sasazuki, S., Wakabayashi, K., Weijenberg, M. P., ... Wu, K. (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, 16(December), 1599–1600. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1)

Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology*, 23(23), 2388–2392. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.012>

Busch, M., Bredeck, G., Kämpfer, A. A. M., & Schins, R. P. F. (2021). Investigations of acute

- effects of polystyrene and polyvinyl chloride micro- and nanoplastics in an advanced in vitro triple culture model of the healthy and inflamed intestine. *Environmental Research*, 193, 110536. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.110536>
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(1), 39–44.
- Campanale, C., Massarelli, C., Savino, I., Locaputo, V., & Uricchio, V. F. (2020). A detailed review study on potential effects of microplastics and additives of concern on human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph17041212>
- Can, A., Semiz, O., & Cinar, O. (2005). Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Molecular Human Reproduction*, 11(6), 389–396. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah179>
- CE. (2018). *Regulamento n.º 213, de 12 de fevereiro de 2018, relativo à utilização de bisfenol A em vernizes e revestimentos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que altera o Regulamento (UE) n.º 10/2011 no que diz respeito à utilização desta substância*. Obtido em 23 de 08 de 2023, de União Europeia: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2018/213/oj>
- Clérigo, Fabiana et al. 2022a. “Cytotoxicity Assessment of Nanoplastics and Plasticizers Exposure in In Vitro Lung Cell Culture Systems—A Systematic Review.” *Toxics* 10(7): 402. <https://www.mdpi.com/2305-6304/10/7/402> (September 16, 2022).

Cingotti, N., & Jensen, G. (2019). *Food Contact Materials and Chemical Contamination*.  
Brussels, Belgium: Health and Environment Alliance.

Cerkvenik-Flajs, Vesna et al. 2022. "Bisphenol A in Edible Tissues of Rams Exposed to Repeated Low-Level Dietary Dose by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection." *Environmental Science and Pollution Research* 29(50): 76078–90. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21154-5>.

Chen, G., Xiong, S., Jing, Q., van Gestel, C. A. M., van Straalen, N. M., Roelofs, D., Sun, L., & Qiu, H. (2023). Maternal exposure to polystyrene nanoparticles retarded fetal growth and triggered metabolic disorders of placenta and fetus in mice. *Science of the Total Environment*, 854(September 2022), 158666. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158666>

Cheng, W., Zhou, Y., Xie, Y., Li, Y., Zhou, R., Wang, H., Feng, Y., & Wang, Y. (2023). Combined effect of polystyrene microplastics and bisphenol A on the human embryonic stem cells-derived liver organoids: The hepatotoxicity and lipid accumulation. *Science of the Total Environment*, 854(8), 158585. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158585>

Choi, D., Bang, J., Kim, T., Oh, Y., Hwang, Y., & Hong, J. (2020). In vitro chemical and physical toxicities of polystyrene microfragments in. *Journal of Hazardous Materials*, 400(June), 123308. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123308>

Choudhary, D., Kurien, C., & Srivastava, A. K. (2020). Microplastic contamination and life cycle assessment of bottled drinking water. *Advances in Water Pollution Monitoring and Control: Select Proceedings from HSFEA 2018*, 41–48.

Christensen, K. L. Y., Lorber, M., Koslitz, S., Brüning, T., & Koch, H. M. (2012). The contribution of diet to total bisphenol A body burden in humans: Results of a 48hour fasting study. *Environment International*, 50, 7–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.09.002>

Cortez, J., & Galvao, A. (1975). *Respiratory disease caused by synthetic fibres: a new occupational disease*. 204–219.

Coupar, P. I., Glidewell, C., & Ferguson, G. (1997). Crystal Engineering Using Bisphenols and Trisphenols. Complexes with Hexamethylenetetramine (HMTA): Strings, Multiple Helices and Chains-of-Rings in the Crystal Structures of the Adducts of HTMA with 4, 4'-Thiodiphenol (1/1), 4, 4'-Sulfonyldiphenol (1/1). *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 53(3), 521–533.

Covaci, A., Hond, E. Den, Geens, T., Govarts, E., Koppen, G., Frederiksen, H., Knudsen, L. E., Mørck, T. A., Gutleb, A. C., Guignard, C., Cocco, E., Horvat, M., Heath, E., Kosjek, T., Mazej, D., Tratnik, J. S., Castaño, A., Esteban, M., Cutanda, F., ... Koch, H. M. (2015). Urinary BPA measurements in children and mothers from six European member states: Overall results and determinants of exposure. *Environmental Research*, 141, 77–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.008>

Cox, K. D., Covernton, G. A., Davies, H. L., Dower, J. F., Juanes, F., & Dudas, S. E. (2019). Human Consumption of Microplastics. *Environmental Science & Technology*, 53(12), 7068–7074. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01517>

da Costa Araújo, A. P., da Luz, T. M., Rocha, T. L., Ahmed, M. A. I., de Melo e Silva, D.,

- Rahman, M. M., & Malafaia, G. (2022). Toxicity evaluation of the combination of emerging pollutants with polyethylene microplastics in zebrafish: Perspective study of genotoxicity, mutagenicity, and redox unbalance. *Journal of Hazardous Materials*, 432, 128691. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128691>
- da Costa Araújo, A. P., de Andrade Vieira, J. E., & Malafaia, G. (2020). Toxicity and trophic transfer of polyethylene microplastics from *Poecilia reticulata* to *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 742, 140217.
- da Costa, J. P. (2018). Micro- and nanoplastics in the environment: Research and policymaking. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 1, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.11.002>
- da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *Science of the Total Environment*, 566–567, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041>
- Dahl, K. H., Hetland, R. B., Holene, E., Binderup, M.-L., Husøy, T., Paulsen, J. E., Sanner, T., Steffensen, I.-L., Thrane, V., & Alexander, J. (2008). Assessment of four studies on developmental neurotoxicity of bisphenol A. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids, Materials in Contact with Food and Cosmetics of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. *VKM Report*.
- de Campos Ventura, B., de Angelis, D. de F., & Marin-Morales, M. A. (2008). Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry*

*and Physiology*, 90(1), 42–51.

De Falco, F., Gullo, M. P., Gentile, G., Di Pace, E., Cocca, M., Gelabert, L., Brouta-Agnésa, M., Rovira, A., Escudero, R., Villalba, R., Mossotti, R., Montarsolo, A., Gavignano, S., Tonin, C., & Avella, M. (2018). Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics. *Environmental Pollution*, 236, 916–925. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.057>

Deepika, D., Sharma, R. P., Schuhmacher, M., Sakhi, A. K., Thomsen, C., Chatzi, L., Vafeiadi, M., Quentin, J., Slama, R., Grazuleviciene, R., Andrušaitytė, S., Waiblinger, D., Wright, J., Yang, T. C., Urquiza, J., Vrijheid, M., Casas, M., Domingo, J. L., & Kumar, V. (2022). Unravelling sex-specific BPA toxicokinetics in children using a pediatric PBPK model. *Environmental Research*, 215(July), 114074. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114074>

Dekant, W., & Völkel, W. (2008). Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 228(1), 114–134. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.12.008>

Domenech, J., de Britto, M., Velázquez, A., Pastor, S., Hernández, A., Marcos, R., & Cortés, C. (2021). Long-term effects of polystyrene nanoplastics in human intestinal Caco-2 cells. *Biomolecules*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/biom11101442>

Domenech, J., Hernández, A., Rubio, L., Marcos, R., & Cortés, C. (2020). Interactions of polystyrene nanoplastics with in vitro models of the human intestinal barrier. *Archives of Toxicology*, 94(9), 2997–3012. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02805-3>

- Domininghaus, H. (1992). *Plastics and their properties. 4. rev. ed. Die Kunststoffe und ihre Eigenschaften.* Alemanha.
- Dong, C. Di, Chen, C. W., Chen, Y. C., Chen, H. H., Lee, J. S., & Lin, C. H. (2020). Polystyrene microplastic particles: In vitro pulmonary toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 385, 121575. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.121575>
- Dufton, P. (1998). *Functional Additives for the Plastics Industry: A Report from Rapra's Industry Analysis Group.* Shrewsbury, UK: CRC Press.
- Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Saad, M., Renault, N., & Tassin, B. (2015). Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environmental Chemistry*, 12(5), 592–599.
- . 2017. "A First Overview of Textile Fibers, Including Microplastics, in Indoor and Outdoor Environments." *Environmental Pollution* 221: 453–58.
- Řurovcová, Ivana et al. 2022. "Genotoxic Potential of Bisphenol A: A Review." *Environmental Pollution* 306: 119346. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749122005607> (May 9, 2022).
- Duis, K., & Coors, A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0069-y>
- ECHA. (2017). Member State Committee for Identification of 4,4-Isopropylidenediphenol (bisphenol A, BPA) as a substance of very high concern. *European Chemicals Agency*,

December, 201–245.

ECHA. (06 de Abril de 2022). *ECHA and the Member States have assessed a group of 148 bisphenols and recommended that more than 30 bisphenols need to be restricted due to their potential hormonal or reprotoxic effects*. Obtido em 04 de 06 de 2023, de <https://www.echa.europa.eu/pt/-/group-assessment-of-bisphenols-identifies-need-for-restriction>

Efimova, I., Bagaeva, M., Bagaev, A., Kileso, A., & Chubarenko, I. P. (2018). Secondary microplastics generation in the sea swash zone with coarse bottom sediments: Laboratory experiments. *Frontiers in Marine Science*, 5(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00313>

EFSA. (2016). *Microplastics and nanoplastics in food-an emerging issue*. EFSA. Obtido em 13 de 02 de 2023, de <https://www.efsa.europa.eu/en/news/microplastics-and-nanoplastics-food-emerging-issue>

EFSA CEF Panel, 2015. (2015). Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 13(1), 3978.

Ehrlich, S., Williams, P. L., Missmer A., S., A., J. B., F., K. C., C., M. A., Xiaoyun, Wright, J., Diane, P., & Hauser, R. (2012). *Urinary Bisphenol A Concentrations and Implantation Failure among Women Undergoing in Vitro Fertilization*. 7, 978–984. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104307>

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.-C., & Pieters, R. (2002). Methods of in vitro toxicology.

*Food and Chemical Toxicology*, 40(2–3), 193–236.

Elkalla, E., Khizar, S., Tarhini, M., Lebaz, N., Zine, N., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., & Elaissari, A. (2023). Core-shell micro/nanocapsules: from encapsulation to applications. In *Journal of microencapsulation* (Vol. 40, Issue 3, pp. 125–156). <https://doi.org/10.1080/02652048.2023.2178538>

Encarnação, I. P. M. F. (2007). *Estudos de migração do bisfenol A em biberões*.

Enyoh, C. E., Shafea, L., Verla, A. W., Verla, E. N., Qingyue, W., Chowdhury, T., & Paredes, M. (2020). *Ecosystems : An Overview*. 35(1), 1–10.

Erler, C., & Novak, J. (2010). Bisphenol a exposure: Human risk and health policy. *Journal of Pediatric Nursing*, 25(5), 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.pedn.2009.05.006>

Evans, R. M., Martin, O. V., Faust, M., & Kortenkamp, A. (2016). Should the scope of human mixture risk assessment span legislative/regulatory silos for chemicals? *Science of the Total Environment*, 543, 757–764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.162>

Eyles, J. E., Bramwell, V. W., Williamson, E. D., & Alpar, H. O. (2001). Microsphere translocation and immunopotentiality in systemic tissues following intranasal administration. *Vaccine*, 19(32), 4732–4742. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00220-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00220-1)

FDA. (2002). *The Safety of Styrene-Based Polymers for Food-Contact Use*. Polystyrene Packaging Council. Arlington.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa,

- H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Fenech, M., & Morley, A. (1985a). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, 43(172–173), 233–246.
- Fenech, M., & Morley, A. A. (1985b). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1–2), 29–36.
- Ferrari, E., Eliso, M. C., Bellingeri, A., Corsi, I., & Spagnuolo, A. (2022). Short-Term Exposure to Nanoplastics Does Not Affect Bisphenol A Embryotoxicity to Marine Ascidian *Ciona robusta*. *Biomolecules*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/biom12111661>
- Forte, M., Iachetta, G., Tussellino, M., Carotenuto, R., Prisco, M., De Falco, M., Laforgia, V., & Valiante, S. (2016). Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. *Toxicology in Vitro*, 31, 126–136. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2015.11.006>
- Fournier, S. B., D’Errico, J. N., Adler, D. S., Kollontzi, S., Goedken, M. J., Fabris, L., Yurkow, E. J., & Stapleton, P. A. (2020). Nanopolystyrene translocation and fetal deposition after acute lung exposure during late-stage pregnancy. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00385-9>
- Fries, Elke et al. 2013. “Identification of Polymer Types and Additives in Marine Microplastic Particles Using Pyrolysis-GC/MS and Scanning Electron Microscopy.” *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 15(10): 1949–56.

- Fu, P., & Kawamura, K. (2010). Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environmental Pollution*, 158(10), 3138–3143. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.040>
- Gigault, Julien et al. 2018. “Current Opinion: What Is a Nanoplastic?” *Environmental Pollution* 235: 1030–34.
- Gajowik, A., Radzikowska, J., & Dobrzyńska, M. M. (2013). Genotoxic effects of bisphenol A on somatic cells of female mice, alone and in combination with X-rays. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 757(2), 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.07.006>
- Gallo, F., Fossi, C., Weber, R., Santillo, D., Sousa, J., Ingram, I., Nadal, A., & Romano, D. (2020). Marine Litter Plastics and Microplastics and Their Toxic Chemicals Components. *Analysis of Nanoplastics and Microplastics in Food*, 159.
- Gao, D., Junaid, M., Chen, X., Liao, H., Chen, G., & Wang, J. (2023). Interaction of micro(nano)plastics and bisphenols in the environment: A recent perspective on adsorption mechanisms, influencing factors and ecotoxic impacts. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 165, 117132. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117132>
- Gärtner, F., David, L., Seruca, R., Machado, J. C., & Sobrinho-Simões, M. (1996). Establishment and characterization of two cell lines derived from human diffuse gastric carcinomas xenografted in nude mice. *Virchows Archiv*, 428(2), 91–98. <https://doi.org/10.1007/bf00193936>
- Geens, T., Apelbaum, T. Z., Goeyens, L., Neels, H., & Covaci, A. (2010). Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Additives and*

*Contaminants* - *Part A*, 27(11), 1627–1637.

<https://doi.org/10.1080/19440049.2010.508183>

Geens, T., Goeyens, L., & Covaci, A. (2011). Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(5), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.04.005>

Gewert, B., Plassmann, M. M., & Macleod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 17(9), 1513–1521. <https://doi.org/10.1039/c5em00207a>

Ginsberg, G., & Rice, D. C. (2009). Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environmental Health Perspectives*, 117(11), 1639–1643. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901010>

Goodson, A., Robin, H., Summerfield, W., & Cooper, I. (2004). Migration of bisphenol A from can coatings - Effects of damage, storage conditions and heating. *Food Additives and Contaminants*, 21(10), 1015–1026. <https://doi.org/10.1080/02652030400011387>

Govarts, E., Gilles, L., Rodriguez Martin, L., Santonen, T., Apel, P., Alvito, P., Anastasi, E., Andersen, H. R., Andersson, A. M., Andryskova, L., Antignac, J. P., Appenzeller, B., Barbone, F., Barnett-Itzhaki, Z., Barouki, R., Berman, T., Bil, W., Borges, T., Buekers, J., Schoeters, G. (2023). Harmonized human biomonitoring in European children, teenagers and adults: EU-wide exposure data of 11 chemical substance groups from the HBM4EU Aligned Studies (2014–2021). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2023.114119>

- Greca, S. C. de A., Kyrou, I., Pink, R., Randeve, H., Grammatopoulos, D., Silva, E., & Karteris, E. (2020). Involvement of the endocrine-disrupting chemical bisphenol a (BPA) in human placentation. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/jcm9020405>
- Grote, K., Brüstle, F., & Vlacil, A. K. (2023). Cellular and Systemic Effects of Micro- and Nanoplastics in Mammals—What We Know So Far. *Materials*, 16(8). <https://doi.org/10.3390/ma16083123>
- Guo, C., Yang, M., Jing, L., Wang, J., Yu, Y., Li, Y., Duan, J., Zhou, X., & Sun, Z. (2016). Amorphous silica nanoparticles trigger vascular endothelial cell injury through apoptosis and autophagy via reactive oxygen species-mediated MAPK/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling. *International Journal of Nanomedicine*, ume 11, 5257–5276. <https://doaj.org/article/f9de071e828a438884e08353c0c01863>
- Gurman, J. L., Baier, L., & Levin, B. C. (1987). Polystyrenes: A review of the literature on the products of thermal decomposition and toxicity. *Fire and Materials*, 11(3), 109–130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fam.810110302>
- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E., & Purnell, P. (2018). An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179–199. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.014>
- Halden, R. U. (2010). Plastics and Health Risks. *Annual Review of Public Health*, 31(1), 179–194. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.012809.103714>
- Hanafi, N. I., Kadir, S., Musa, M., & Karim, Z. (2019). Low concentration of bisphenol A

induces proliferation of gastric cancer cells, HGC-27. *J Teknol*, 81, 115–121.

Hansen, E., Nilsson, N., Lithner, D., & Lassen, C. (2013). *Hazardous Substances in Plastic Materials; forurensningsdirektoratet*. Vejle, Denmark: Klima- og.

Harnett, K. G., Chin, A., & Schuh, S. M. (2021). Cytotoxic and apoptotic data of BPA and BPA alternatives TMBPF, BPAF, and BPS in female adult rat and human stem cells. *Data in Brief*, 37, 107183. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107183>

Hartmann, A., & Speit, G. (1997). The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*, 90(2–3), 183–188.

Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coecke, S., Gstraunthaler, G., & Lewis, D. (2002). ECVAM good cell culture practice task force report 1. *Alternatives to Laboratory Animals*, 30(4), 407–414.

Hernández, A. F., & Tsatsakis, A. M. (2017). Human exposure to chemical mixtures: challenges for the integration of toxicology with epidemiology data in risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 103, 188–193.

Herrala, M., Huovinen, M., Järvelä, E., Hellman, J., Tolonen, P., Lahtela-kakkonen, M., & Rysä, J. (2023). *Science of the Total Environment Micro-sized polyethylene particles affect cell viability and oxidative stress responses in human colorectal adenocarcinoma Caco-2 and HT-29 cells*. 867(January). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161512>

Herrero, L., Quintanilla-López, J. E., Fernández, M. A., & Gómara, B. (2021). Plasticisers and preservatives in commercial milk products: A comprehensive study on packages used in

the Spanish market. *Food Chemistry*, 338(September 2020), 128031.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128031>

Hesler, M., Aengenheister, L., Ellinger, B., Drexel, R., Straskraba, S., Jost, C., Wagner, S., Meier, F., von Briesen, H., Büchel, C., Wick, P., Buerki-Thurnherr, T., & Kohl, Y. (2019). Multi-endpoint toxicological assessment of polystyrene nano- and microparticles in different biological models in vitro. *Toxicology in Vitro*, 61.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104610>

Hiemstra, Pieter S. et al. 2018. "Human Lung Epithelial Cell Cultures for Analysis of Inhaled Toxicants: Lessons Learned and Future Directions." *Toxicology in Vitro* 47: 137–46.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233317303569>.

Hirai, Hisashi et al. 2011. "Organic Micropollutants in Marine Plastics Debris from the Open Ocean and Remote and Urban Beaches." *Marine Pollution Bulletin* 62(8): 1683–92.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X1100316X> (October 11, 2022).

Hua, Liting et al. 2022. "Occurrence and Profile Characteristics of Environmental Phenols in Human Urine from a Rural Area in Northwestern China." *Environmental Pollution* 315: 120405.

Huang, R. ping, Liu, Z. hua, Yuan, S. fen, Yin, H., Dang, Z., & Wu, P. xiao. (2017). Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000–2016) and its risk analysis. *Environmental Pollution*, 230, 143–152.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.026>

Huang, Y. Q., Wong, C. K. C., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin,

- L., & Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42(1), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.04.010>
- Hurley, M. J., Gottuk, D. T., Hall Jr, J. R., Harada, K., Kuligowski, E. D., Puchovsky, M., Watts Jr, J. M., & WIECZOREK, C. J. (2015). *SFPE handbook of fire protection engineering*. Springer.
- Hyun, Moonjung et al. 2021. “Comparative Toxicities of BPA, BPS, BPF, and TMBPF in the Nematode *Caenorhabditis Elegans* and Mammalian Fibroblast Cells.” *Toxicology* 461(August): 152924. <https://doi.org/10,1016/j.tox.2021.152924>.
- IARC. (07 de 09 de 2023). *Global cancer observation*. Obtido em 15 de 09 de 2023, de Internacional Agency for Research on Cancer: <https://gco.iarc.fr/>
- Ipatimup. (s.d.). *Ipatimup*. Obtido em 27 de 02 de 2023, de Ipatimup: <https://www.ipatimup.pt/FileMgr/DownloadFile.aspx?SelectedNodeId=2327>
- Inkielewicz-Stepniak, I., Tajber, L., Behan, G., Zhang, H., Radomski, M. W., Medina, C., & Santos-Martinez, M. J. (2018). The role of mucin in the toxicological impact of polystyrene nanoparticles. *Materials*, 11(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ma11050724>
- International Agency for Research on Cancer. (2020). Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for the IARC Monographs during 2020–2024. *IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans, April 2014*, i-ix+1-390. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/mono83-1.pdf>

- Ismail, O. I., & El-Meligy, M. M. S. (2022). Curcumin ameliorated low dose-Bisphenol A induced gastric toxicity in adult albino rats. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14158-1>
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, *347*(6223), 768–771.
- Javurek, A. B., Spollen, W. G., Johnson, S. A., Bivens, N. J., Bromert, K. H., Givan, S. A., & Rosenfeld, C. S. (2016). Effects of exposure to bisphenol A and ethinyl estradiol on the gut microbiota of parents and their offspring in a rodent model. *Gut Microbes*, *7*(6), 471–485. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1234657>
- Jenner, L. C., Rotchell, J. M., Bennett, R. T., Cowen, M., Tentzeris, V., & Sadofsky, L. R. (2022). Detection of microplastics in human lung tissue using  $\mu$ FTIR spectroscopy. *Science of the Total Environment*, *831*(March), 154907. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154907>
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Kim, D.-H., Han, J., Hwang, D.-S., Souissi, S., Lee, S.-J., Shin, K.-H., & Park, H. G. (2017). Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. *Scientific Reports*, *7*(1), 41323.
- Jin, Y., Lu, L., Tu, W., Luo, T., & Fu, Z. (2019). Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. *Science of the Total Environment*, *649*, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.353>

- Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., & Fu, Z. (2018). Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution*, 235, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088>
- Johannaber, F., & Michaeli, W. (2004). Anhang. In *Handbuch Spritzgießen* (pp. 1269–1273). Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG. <https://doi.org/doi:10.3139/9783446440982.017>
- Jones, K. C. (2021). Persistent Organic Pollutants (POPs) and Related Chemicals in the Global Environment: Some Personal Reflections. *Environmental Science & Technology*, 55(14), 9400–9412. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c08093>
- Jordan, J., Zare, A., Jackson, L. J., Habibi, H. R., & Weljie, A. M. (2012). Environmental contaminant mixtures at ambient concentrations invoke a metabolic stress response in goldfish not predicted from exposure to individual compounds alone. *Journal of Proteome Research*, 11(2), 1133–1143. <https://doi.org/10.1021/pr200840b>
- Kannan, K., & Vimalkumar, K. (2021). A Review of Human Exposure to Microplastics and Insights Into Microplastics as Obesogens. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 12, Issue August, pp. 1–19). <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.724989>
- Kaur, K., Chauhan, V., Gu, F., & Chauhan, A. (2014). Bisphenol A induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphoblasts from children with autism and unaffected siblings. In *Free radical biology & medicine* (Vol. 76, pp. 25–33). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.030>
- Khan, N. G., Correia, J., Adiga, D., Rai, P. S., Dsouza, H. S., Chakrabarty, S., & Kabekkodu, S. P. (2021). A comprehensive review on the carcinogenic potential of bisphenol A: clues

and evidence. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(16), 19643–19663.

<https://doi.org/10.1007/s11356-021-13071-w>

Kik, K., Bukowska, B., Krokosz, A., & Sicińska, P. (2021). Oxidative properties of polystyrene nanoparticles with different diameters in human peripheral blood mononuclear cells (In vitro study). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9).

<https://doi.org/10.3390/ijms22094406>

Kik, K., Bukowska, B., & Sicińska, P. (2020). Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms.

*Environmental Pollution*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114297>

Kim, C. H., Kim, M. J., Park, J., Kim, J., Kim, J. Y., An, M. J., Shin, G. S., Lee, H. M., & Kim, J. W. (2021). Bisphenol a exposure changes the transcriptomic and proteomic dynamics of

human retinoblastoma y79 cells. *Genes*, 12(2), 1–18.

<https://doi.org/10.3390/genes12020264>

Kim, E. H., Choi, S., Kim, D., Park, H. J., Bian, Y., Choi, S. H., Chung, H. Y., & Bae, O. N.

(2022). Amine-modified nanoplastics promote the procoagulant activation of isolated

human red blood cells and thrombus formation in rats. *Particle and Fibre Toxicology*,

UMSICHT. (14 de 08 de 2023). *Fraunhofer UMSICHT*. Obtido de <https://www.umsicht.fraunhofer.de/de/projekte/tyrewearmapping.htm>

19(1), 1–15.

<https://doi.org/10.1186/s12989-022-00500-y>

- Kimber, Ian, Nicole Woeffen, and Kevin Sondenheimer. 2022. "Bisphenol A, TH17 Cells, and Allergy: A Commentary." *Journal of Immunotoxicology* 19(1): 93–99. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2022.2113842>.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., & Van Hummelen, P. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1–2), 19–30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr, M., Kirchner, S., Lorge, E., & Morita, T. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 153–163.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr, M., Lorge, E., Norppa, H., & Surrallés, J. (2000). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 167–172.
- Kirstein, I. V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Eler, R., Löder, M., & Gerdts, G. (2016). Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Marine Environmental Research*, 120, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.07.004>
- Klein, Malin, and Elke K. Fischer. 2019. "Microplastic Abundance in Atmospheric Deposition within the Metropolitan Area of Hamburg, Germany." *Science of The Total Environment* 685: 96–103.

- Klemeš, J. J., Fan, Y. Van, Tan, R. R., & Jiang, P. (2020). Minimising the present and future plastic waste, energy and environmental footprints related to COVID-19. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 127(April). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109883>
- Kommission, S. Der. (2012). Stoffmonographie für bisphenol A (BPA) - Referenz- und Human-Biomonitoring-(HBM)-Werte für BPA im Urin. Stellungnahme der kommission human-biomonitoring des umweltbundesamtes. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 55(9), 1215–1231. <https://doi.org/10.1007/s00103-012-1525-0>
- Kumar, R., Manna, C., Padha, S., Verma, A., Sharma, P., Dhar, A., Ghosh, A., & Bhattacharya, P. (2022). Micro(nano)plastics pollution and human health: How plastics can induce carcinogenesis to humans? *Chemosphere*, 298(February), 134267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134267>
- Kundakovic, M., Gudsnuk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R. L., Perera, F. P., & Champagne, F. A. (2013). Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol a exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), 9956–9961. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214056110>
- Kwak, J. Il, Moon, J., Kim, D., Cui, R., & An, Y. J. (2018). Determination of the soil hazardous concentrations of bisphenol A using the species sensitivity approach. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.048>
- Kyrila, G., Katsoulas, A., Schoretsaniti, V., Rigopoulos, A., Rizou, E., Doulgeridou, S., Sarli,

- V., Samanidou, V., & Touraki, M. (2021). Bisphenol A removal and degradation pathways in microorganisms with probiotic properties. *Journal of Hazardous Materials*, 413(November 2020), 125363. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125363>
- Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Silano, V., Steffensen, I. L., Tlustos, C., Vernis, L., Zorn, H., Batke, M., Bignami, M., ... Van Loveren, H. (2023). Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 21(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.6857>
- Lauren, P. (1965). The two Histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 64, 31–49. <https://doi.org/10.1111/apm.1965.64.1.31>
- Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2019). Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. In *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512>
- Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, 163(December 2021), 107199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>
- Li, B., Ding, Y., Cheng, X., Sheng, D., Xu, Z., Rong, Q., Wu, Y., Zhao, H., Ji, X., & Zhang, Y. (2020). Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. *Chemosphere*, 244, 125492.

<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125492>

- Li, J., Qu, X., Su, L., Zhang, W., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., & Shi, H. (2016). Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environmental Pollution*, 214, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.012>
- Li, X., Jin, P., An, Q., Wang, Z., Lv, X., Wei, H., Wu, J., Wu, J., & Wang, Z. (2011). A high-performance quantum dot superluminescent diode with a two-section structure. *Nanoscale Research Letters*, 6, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-625>
- Li, Yaowei et al. 2020. "Airborne Fiber Particles: Types, Size and Concentration Observed in Beijing." *Science of The Total Environment* 705: 135967.
- Li, Z., Mao, W., Yao, L., Zhao, N., Zhang, Y., Zhao, M., & Jin, H. (2022). First report on occurrence of bisphenol A isomers in human serum and whole blood. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127549. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.127549>
- Liao, Y. liang, & Yang, J. yan. (2020). Microplastic serves as a potential vector for Cr in an in-vitro human digestive model. *Science of The Total Environment*, 703, 134805. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.134805>
- Lickly, T. D., Breder, C. V., & Rainey, M. L. (1995). A Model for Estimating the Daily Dietary Intake of a Substance from Food-Contact Articles: Styrene from Polystyrene Food Contact Polymers. In *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (Vol. 21, Issue 3, pp. 406–417). <https://doi.org/10.1006/rtph.1995.1055>
- Liebezeit, G., & Liebezeit, E. (2013). Non-pollen particulates in honey and sugar. *Food*

*Additives and Contaminants - Part A*, 30(12), 2136–2140.

<https://doi.org/10.1080/19440049.2013.843025>

Lim, Dongyoung et al. 2021. "Inhalation Toxicity of Polystyrene Micro(Nano)Plastics Using Modified OECD TG 412." *Chemosphere* 262: 128330.

Liu, Chunguang et al. 2019. "Widespread Distribution of PET and PC Microplastics in Dust in Urban China and Their Estimated Human Exposure." *Environment International* 128(January): 116–24.

Liu, C., Li, J., Zhang, Y., Wang, L., Deng, J., Gao, Y., Yu, L., Zhang, J., & Sun, H. (2019). Widespread distribution of PET and PC microplastics in dust in urban China and their estimated human exposure. *Environment International*, 128(January), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.024>

Liu, K., Wang, X., Fang, T., Xu, P., Zhu, L., & Li, D. (2019). Source and potential risk assessment of suspended atmospheric microplastics in Shanghai. *Science of the Total Environment*, 675, 462–471. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.110>

Liu, K., Wu, T., Wang, X., Song, Z., Zong, C., Wei, N., & Li, D. (2019). Consistent Transport of Terrestrial Microplastics to the Ocean through Atmosphere. *Environmental Science and Technology*, 53(18), 10612–10619. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03427>

Liu, Ling et al. 2021. "Science of the Total Environment Cellular Internalization and Release of Polystyrene Microplastics and Nanoplastics." *Science of the Total Environment* 779: 146523. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146523>.

- Liu, S., Li, H., Wang, J., Wu, B., & Guo, X. (2022). Polystyrene microplastics aggravate inflammatory damage in mice with intestinal immune imbalance. *Science of the Total Environment*, 833(639), 155198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155198>
- Lobelle, D., & Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*, 62(1), 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.10.013>
- Lorber, M., Schechter, A., Paepke, O., Shropshire, W., Christensen, K., & Birnbaum, L. (2015). Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures. *Environment International*, 77, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.01.008>
- Loss, C., Syrovets, T., Musyanovych, A., Landfester, K., Nienhaus, U. G., & Simmet, T. (2014). *Functionalized Polystyrene Nanoparticles As a Platform for Studying Bio-Nanointeractions*, *Beilstein J. Nanotechnol.*
- Lu, J., Wu, J., Wu, J., Zhang, C., & Luo, Y. (2021). Adsorption and Desorption of Steroid Hormones by Microplastics in Seawater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 107(4), 730–735. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02784-2>
- Lu, L., Luo, T., Zhao, Y., Cai, C., Fu, Z., & Jin, Y. (2019). Interaction between microplastics and microorganism as well as gut microbiota: A consideration on environmental animal and human health. *Science of the Total Environment*, 667, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.380>
- Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., & Jin, Y. (2018). Polystyrene microplastics induce gut

- microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Science of the Total Environment*, 631–632, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.051>
- Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., & Ren, H. (2016). Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. *Environmental Science and Technology*, 50(7), 4054–4060. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183>
- Luqman, A., Nugrahapraja, H., Wahyuono, R. A., Islami, I., Haekal, M. H., Fardiansyah, Y., Putri, B. Q., Amalludin, F. I., Rofiqah, E. A., Götz, F., & Wibowo, A. T. (2021). Microplastic contamination in human stools, foods, and drinking water associated with Indonesian coastal population. *Environments - MDPI*, 8(12), 1–9. <https://doi.org/10.3390/environments8120138>
- Lv, Y., Lu, S., Dai, Y., Rui, C., Wang, Y., Zhou, Y., Li, Y., Pang, Q., & Fan, R. (2017). Higher dermal exposure of cashiers to BPA and its association with DNA oxidative damage. *Environment International*, 98, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.10.001>
- MacGregor, J. T., Casciano, D., & Müller, L. (2000). Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 3–20.
- Mantovani, A. (2015). Endocrine Disrupters and the Safety of Food Chains. *Hormone Research in Paediatrics*, 86(4), 279–288. <https://doi.org/10.1159/000441496>
- Mario Pes, G., Fanciulli, G., Delitala, A. P., Piana, A. F., & Dore, M. P. (2021). Spatial Association between Gastric Cancer Mortality and Goiter in Sardinia. *Asian Pacific*

<https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.1.105>

Marsh, J. P., Mossman, B. T., Driscoll, K. E., Schins, R. F., & Borm, P. J. A. (1994). Effects of Aramid, a high Strength Synthetic Fiber, on Respiratory Cells in Vitro. *Drug and Chemical Toxicology*, 17(2), 75–92. <https://doi.org/10.3109/01480549409014303>

Martínez, María Ángeles et al. 2021. “Human Biomonitoring of Bisphenol A along Pregnancy: An Exposure Reconstruction of the EXHES-Spain Cohort.” *Environmental Research* 196: 110941.

Marturano, V., Cerruti, P., & Ambrogi, V. (2019). Polymer additives. *Physical Sciences Reviews*, 2(6), 1–20. <https://doi.org/10.1515/psr-2016-0130>

Massos, A., & Turner, A. (2017). Cadmium, lead and bromine in beached microplastics. *Environmental Pollution*, 227, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.034>

Mastrangelo, G., Fedeli, U., Fadda, E., Milan, G., & Lange, J. H. (2002). Epidemiologic evidence of cancer risk in textile industry workers: A review and update. *Toxicology and Industrial Health*, 18(4), 171–181. <https://doi.org/10.1191/0748233702th139rr>

Mendonca, K., Hauser, R., Calafat, A. M., Arbuckle, T. E., & Duty, S. M. (2014). Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 87(1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00420-012-0834-9>

Meng, H., Xia, T., George, S., & Nel, A. E. (2009). A predictive toxicological paradigm for the

safety assessment of nanomaterials. *ACS Nano*, 3(7), 1620–1627.

<https://doi.org/10.1021/nn9005973>

Mohamed Nor, N. H., Kooi, M., Diepens, N. J., & Koelmans, A. A. (2021). Lifetime Accumulation of Microplastic in Children and Adults. *Environmental Science and Technology*, 55(8), 5084–5096. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07384>

Mordor intelligent. (2022). *MERCADO DE ESTIRENO - CRESCIMENTO, TENDÊNCIAS, IMPACTO DO COVID-19 E PREVISÕES (2023-2028)*. India. Obtido em 04 de 07 de 2023, de <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/styrene-market>

Mutti, A., Buzio, C., Perazzoli, F., Bergamaschi, E., Bocchi, M. C., Selis, L., Mineo, F., & Franchini, I. (1992). [Lymphocyte subpopulations in workers exposed occupationally to styrene]. *La Medicina Del Lavoro*, 83(2), 167–177. <http://europepmc.org/abstract/MED/1630405>

Myers, J. P., Zoeller, R. T., & Vom Saal, F. S. (2009). A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environmental Health Perspectives*, 117(11), 1652–1655. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900887>

Nickens, K. P., Patierno, S. R., & Ceryak, S. (2010). Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), 276–288. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.018>

Nicole, W. (2015). *Unexpected activity: evidence for obesogenicity of a BPA metabolite*. National Institute of Environmental Health Sciences.

No, R. (2008). 1272/2008 of the European Parliament and of the council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC and amending Regulation (EC) No 1907/2006. *Official J Eur Union*, 353, 1.

Noureddine El Moussawi, S., Karam, R., Cladière, M., Chébib, H., Ouaini, R., & Camel, V. (2018). Effect of sterilisation and storage conditions on the migration of bisphenol A from tinfoil cans of the Lebanese market. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 35(2), 377–386. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1395521>

NRC. (2014). *Review of the Environmental Protection Agency's State-of-the-Science Evaluation of Nonmonotonic Dose–Response Relationships as They Apply to Endocrine Disruptors*. Washington, DC: National Academies Press.

Ogonowski, Martin, Christoph Schür, Åsa Jarsén, and Elena Gorokhova. 2016. “The Effects of Natural and Anthropogenic Microparticles on Individual Fitness in *Daphnia Magna*.” *PLoS ONE* 11(5): 1–20.

Ola-Davies, O. E., & Olukole, S. G. (2018). Gallic acid protects against bisphenol A-induced alterations in the cardio-renal system of Wistar rats through the antioxidant defense mechanism. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 1786–1794. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.08.108>

Oldenburg, Julia et al. 2021. “Different Bisphenols Induce Non-Monotonous Changes in MiRNA Expression and LINE-1 Methylation in Two Cell Lines.” *Environmental Epigenetics*

7(1): 1–10.

Oliveira, L. P. L. de. (2017). *Efeitos do estímulo agudo da foliculogênese com eCG e DHEA sobre morfologia ovariana e hormônios sexuais em ratas pré-púberes e revisão sistemática sobre modelos animais em PCOS.*

Olukole, S. G., Lanipekun, D. O., Ola-Davies, E. O., & Oke, B. O. (2019). Melatonin attenuates bisphenol A-induced toxicity of the adrenal gland of Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(6), 5971–5982. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-4024-5>

Oz, F., & Seyyar, E. (2016). Formation of Heterocyclic Aromatic Amines and Migration Level of Bisphenol-A in Sous-Vide-Cooked Trout Fillets at Different Cooking Temperatures and Cooking Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(15), 3070–3082. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05716>

Ozaki, A., Yamaguchi, Y., Fujita, T., Kuroda, K., & Endo, G. (2004). Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. *Food and Chemical Toxicology*, 42(8), 1323–1337. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.03.010>

Paget, V., Dekali, S., Kortulewski, T., Grall, R., Gamez, C., Blazy, K., Aguerre-Chariol, O., Chevillard, S., Braun, A., Rat, P., & Lacroix, G. (2015). Specific uptake and genotoxicity induced by polystyrene nanobeads with distinct surface chemistry on human lung epithelial cells and macrophages. *PLoS ONE*, 10(4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123297>

Pannetier, P., Morin, B., Le Bihanic, F., Dubreil, L., Clérandeau, C., Chouvellon, F., Van Arkel,

- K., Danion, M., & Cachot, J. (2020). Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. *Environment International*, 134(November 2019), 105047. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105047>
- Parry, J. M., & Sors, A. (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential environmental chemicals: The European Community Aneuploidy Project. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 287(1), 3–15.
- Patel, Mayur M et al. 2009. "Getting into the Brain." *CNS Drugs* 23(1): 35–58.
- Pathan, S. I., Arfaioi, P., Bardelli, T., Ceccherini, M. T., Nannipieri, P., & Pietramellara, G. (2020). Soil pollution from micro-and nanoplastic debris: A hidden and unknown biohazard. *Sustainability (Switzerland)*, 12(18), 1–31. <https://doi.org/10.3390/su12187255>
- Paul-Pont, I., Lacroix, C., Fernández, C. G., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frère, L., Cassone, A.-L., Sussarellu, R., & Fabioux, C. (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 216, 724–737.
- Peixoto, D., Pinheiro, C., Amorim, J., Oliva-Teles, L., Guilhermino, L., & Vieira, M. N. (2019). Microplastic pollution in commercial salt for human consumption: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 219(January 2018), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.02.018>
- Pfeifer, D., Chung, Y. M., & Hu, M. C. T. (2015). Effects of low-dose bisphenol A on DNA damage and proliferation of breast cells: The role of c-Myc. *Environmental Health*

*Perspectives*, 123(12), 1271–1279. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409199>

Phuong, Nam Ngoc et al. 2018. “Factors Influencing the Microplastic Contamination of Bivalves from the French Atlantic Coast: Location, Season and/or Mode of Life?” *Marine Pollution Bulletin* 129(2): 664–74.

Pivonello, Claudia et al. 2020. “Bisphenol A: An Emerging Threat to Female Fertility.” *Reproductive Biology and Endocrinology* 18(1): 4–11.

Plastics Europe. (2021). *Plastics – the Facts 2021*. Obtido em 06 de 11 de 2022, de <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>

Poma, A., Vecchiotti, G., Colafarina, S., Zarivi, O., Aloisi, M., Arrizza, L., Chichiriccò, G., & Di Carlo, P. (2019). In vitro genotoxicity of polystyrene nanoparticles on the human fibroblast hs27 cell line. *Nanomaterials*, 9(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nano9091299>

Prata, J. C. (2018). Airborne microplastics: Consequences to human health? *Environmental Pollution*, 234, 115–126. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2017.11.043>

Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2020). Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of The Total Environment*, 702, 134455. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.134455>

Preethi, S., Sandhya, K., Lebonah, D. E., Prasad, C. V., Sreedevi, B., Chandrasekhar, K., & Kumari, J. P. (2014). Toxicity of Bisphenol a on Humans: A Review. *International Letters of Natural Sciences*, 27, 32–46. <https://doi.org/10.56431/p-p6v18m>

Promega. (2019). *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*. Obtido em 05 de 02 de 2023, de

Promega: [https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter\\_blue-cell-viability-assay/?catNum=G8080](https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_blue-cell-viability-assay/?catNum=G8080)

Qiao, R., Deng, Y., Zhang, S., Wolosker, M. B., Zhu, Q., Ren, H., & Zhang, Y. (2019).

Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere*, 236, 124334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.065>

Qu, W., Zhao, Z., Chen, S., Zhang, L., Wu, D., & Chen, Z. (2018). Bisphenol A suppresses

proliferation and induces apoptosis in colonic epithelial cells through mitochondrial and MAPK/AKT pathways. *Life Sciences*, 208, 167–174. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2018.07.040>

Radwan, E. K., Ibrahim, M. B. M., Adel, A., & Farouk, M. (2020). The occurrence and risk

assessment of phenolic endocrine-disrupting chemicals in Egypt's drinking and source water. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(2), 1776–1788. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06887-0>

Ragusa, A., Notarstefano, V., Svelato, A., Belloni, A., Gioacchini, G., Blondeel, C., Zucchelli,

E., De Luca, C., D'avino, S., Gulotta, A., Carnevali, O., & Giorgini, E. (2022). Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. *Polymers*, 14(13), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym14132700>

Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa,

F., Ciro, M., Rongioletti, A., Baiocco, F., Draghi, S., Amore, E. D., Rinaldo, D., Matta, M.,

- & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, 146, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>
- Ramos, C., Ladeira, C., Zeferino, S., Dias, A., Faria, I., Cristovam, E., Gomes, M., & Ribeiro, E. (2019). Cytotoxic and genotoxic effects of environmental relevant concentrations of bisphenol A and interactions with doxorubicin. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 838(June 2018), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.009>
- Rashtian, J., Chavkin, D. E., & Merhi, Z. (2019). Water and soil pollution as determinant of water and food quality/contamination and its impact on female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0448-5>
- Reddy, A. B., Reddy, G. S. M., Jayaramudu, J., Sudhakar, K., Manjula, B., Ray, S. S., & Sadiku, E. R. (2015). Polyethylene Terephthalate-Based Blends: Natural Rubber and Synthetic Rubber. *Poly(Ethylene Terephthalate) Based Blends, Composites and Nanocomposites*, 75–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-31306-3.00005-1>
- Revel, M., Châtel, A., & Mouneyrac, C. (2018). Micro(nano)plastics: A threat to human health? *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 1, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.003>
- Rezania, S., Park, J., Md Din, M. F., Mat Taib, S., Talaiekhosani, A., Kumar Yadav, K., & Kamyab, H. (2018). Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Marine Pollution Bulletin*, 133(May), 191–208.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.022>

- Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N., & Mornagui, B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*, 64, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.007>
- Ribeiro, E., Ladeira, C., & Viegas, S. (2017). EDCs mixtures: A stealthy hazard for human health? *Toxics*, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/toxics5010005>
- . 2017b. “Occupational Exposure to Bisphenol A (BPA): A Reality That Still Needs to Be Unveiled.” *Toxics* 5(3): 1–16.
- Richards, D. M., & Endres, R. G. (2017). How cells engulf: A review of theoretical approaches to phagocytosis. *Reports on Progress in Physics*, 80(12). <https://doi.org/10.1088/1361-6633/aa8730>
- Rillig, M. C., Ingraffia, R., & De Souza Machado, A. A. (2017). Microplastic incorporation into soil in agroecosystems. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 8–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01805>
- Roch, S., Friedrich, C., & Brinker, A. (2020). Uptake routes of microplastics in fishes: practical and theoretical approaches to test existing theories. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60630-1>
- Rochman, C. M. (2018). Microplastics research — from sink to source in freshwater systems. *Science*, 360(6384), 28–29.
- Rubio, Laura et al. 2020a. “Biological Effects , Including Oxidative Stress and Genotoxic

Damage , of Polystyrene Nanoparticles in Different Human Hematopoietic Cell Lines.”

*Journal of Hazardous Materials* 398(March): 122900.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122900>.

Rubio, Laura, Ricard Marcos, and Alba Hernández. 2020. “Potential Adverse Health Effects of Ingested Micro- and Nanoplastics on Humans. Lessons Learned from in Vivo and in Vitro Mammalian Models.” *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* 23(2): 51–68. <https://doi.org/10.1080/10937404.2019.1700598>.

Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2011.05.002>

Rudel, R. A., Gray, J. M., Engel, C. L., Rawsthorne, T. W., Dodson, R. E., Ackerman, J. M., Rizzo, J., Nudelman, J. L., & Brody, J. G. (2011). Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethyhexyl) phthalate exposure: Findings from a dietary intervention. *Environmental Health Perspectives*, 119(7), 914–920. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003170>

Sangkham, S., Faikhaw, O., Munkong, N., Sakunkoo, P., Arunlertaree, C., Chavali, M., Mousazadeh, M., & Tiwari, A. (2022). A review on microplastics and nanoplastics in the environment: Their occurrence, exposure routes, toxic studies, and potential effects on human health. *Marine Pollution Bulletin*, 181(March), 113832. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113832>

Sasso, A. F., Pirow, R., Andra, S. S., Church, R., Nachman, R. M., Linke, S., Kapraun, D. F., Schurman, S. H., Arora, M., & Thayer, K. A. (2020). Pharmacokinetics of bisphenol A in

humans following dermal administration. *Environment International*, 144, 106031.

Sastri, R. (2010). *Polymer Additives Used to Enhance Material Properties for Medical Device*

*Applications* (1° ed.). (W. Andrew, Ed.) Norwich, NY, EUA. Obtido em 01 de 08 de 2023

Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). Parent

bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental*

*Health Perspectives*, 110(11), A703–A707.

Schröter, L., & Ventura, N. (2022). Nanoplastic Toxicity: Insights and Challenges from

Experimental Model Systems. *Small*, 18(31). <https://doi.org/10.1002/smll.202201680>

Scopetani, C., Cincinelli, A., Martellini, T., Lombardini, E., Ciofini, A., Fortunati, A., Pasquali,

V., Ciattini, S., & Ugolini, A. (2018). Ingested microplastic as a two-way transporter for

PBDEs in *Talitrus saltator*. *Environmental Research*, 167(July), 411–417.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.07.030>

Senathirajah, K., Attwood, S., Bhagwat, G., Carbery, M., Wilson, S., & Palanisami, T. (2021).

Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human

health risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 404(Part B).

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124004>

Seymour, R. B. (1976). The Role of Fillers and Reinforcements in Plastics Technology.

*Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 7(1), 49–79.

<https://doi.org/10.1080/03602557608063110>

SG, O., DO, L., EO, O.-D., & BO, O. (2019). Melatonin attenuates bisphenol A-induced toxicity

of the adrenal gland of Wistar rats. In *Environmental science and pollution research international* (Vol. 26, Issue 6, pp. 5971–5982). <https://doi.org/10.1007/s11356-018-4024-5>

Shi, Q., Tang, J., Wang, L., Liu, R., & Giesy, J. P. (2021). Combined cytotoxicity of polystyrene nanoplastics and phthalate esters on human lung epithelial A549 cells and its mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112041. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112041>

Shi, X., Wang, X., Huang, R., Tang, C., Hu, C., Ning, P., & Wang, F. (2022). Cytotoxicity and Genotoxicity of Polystyrene Micro-and Nanoplastics with Different Size and Surface Modification in A549 Cells. *International Journal of Nanomedicine*, 17(September), 4509–4523. <https://doi.org/10.2147/IJN.S381776>

Sierra, L. M., & Gaivão, I. (2014). Genotoxicity and DNA Repair. *New York*.

Singh, B., & Sharma, N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93(3), 561–584. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G. G., Wright, C. J., & Doak, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(23–24), 3891–3914. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>

Snopczyński, T., Góralczyk, K., Czaja, K., Struciński, P., Hernik, A., Korcz, W., & Ludwicki, J. K. (2009). [Nanotechnology--possibilities and hazards]. *Roczniki Państwowego Zakładu*

*Higiény*, 60(2), 101–111. <http://europepmc.org/abstract/MED/19803438>

Sørensen, L., Rogers, E., Altin, D., Salaberria, I., & Booth, A. M. (2020). Sorption of PAHs to microplastic and their bioavailability and toxicity to marine copepods under co-exposure conditions. *Environmental Pollution*, 258, 113844.

de Souza Machado, Anderson Abel et al. 2018. "Microplastics as an Emerging Threat to Terrestrial Ecosystems." *Global Change Biology* 24(4): 1405–16.

Stecca, L., I. Moscoso-Ruiz, Y. Gálvez-Ontiveros, and A. Rivas. 2022. "Association between Dietary Exposure to Bisphenols and Body Mass Index in Spanish Schoolchildren." *EFSA Journal* 20(S1): 1–13.

Stojanović, B., Radović, L., Natić, D., Dodevska, M., Vraštanović-Pavičević, G., Balaban, M., Lević, S., Petrović, T., & Antić, V. (2019). Influence of a storage conditions on migration of bisphenol A from epoxy-phenolic coating to canned meat products. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 84(4), 377–389. <https://doi.org/10.2298/JSC181015100S>

Sun, L., Peng, T., Liu, F., Ren, L., Peng, Z., Ji, G., Zhou, Y., & Fu, Z. (2016). Transcriptional responses in male Japanese medaka exposed to antiandrogens and antiandrogen/androgen mixtures. *Environmental Toxicology*, 31(11), 1591–1599. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/tox.22163>

Sungur, Ş., Koroğlu, M., & Özkan, A. (2014). Determination of bisphenol a migrating from canned food and beverages in markets. *Food Chemistry*, 142, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.034>

- Takeda, Y., Liu, X., Sumiyoshi, M., Matsushima, A., Shimohigashi, M., & Shimohigashi, Y. (2009). Placenta Expressing the Greatest Quantity of Bisphenol A Receptor ERR $\gamma$  among the Human Reproductive Tissues: Predominant Expression of Type-1 ERR $\gamma$  Isoform. *The Journal of Biochemistry*, *146*(1), 113–122. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp049>
- Tang, Y., Rong, J., Guan, X., Zha, S., Shi, W., Han, Y., Du, X., Wu, F., Huang, W., & Liu, G. (2020). Immunotoxicity of microplastics and two persistent organic pollutants alone or in combination to a bivalve species. *Environmental Pollution*, *258*, 113845. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113845>
- Taylor, K. W., Joubert, B. R., Braun, J. M., Dilworth, C., Gennings, C., Hauser, R., Heindel, J. J., Rider, C. V, Webster, T. F., & Carlin, D. J. (2016). Statistical approaches for assessing health effects of environmental chemical mixtures in epidemiology: lessons from an innovative workshop. *Environmental Health Perspectives*, *124*(12), A227–A229.
- Thayer, K. A., Doerge, D. R., Hunt, D., Schurman, S. H., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Garantziotis, S., Kissling, G. E., Easterling, M. R., Bucher, J. R., & Birnbaum, L. S. (2015). Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environment International*, *83*, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.008>
- Togasaki, K., Sugimoto, S., Ohta, Y., Nanki, K., Matano, M., Takahashi, S., Fujii, M., Kanai, T., & Sato, T. (2021). Wnt Signaling Shapes the Histologic Variation in Diffuse Gastric Cancer. *Gastroenterology*, *160*(3), 823–830. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.047>
- Tsatsakis, A. M., Kouretas, D., Tzatzarakis, M. N., Stivaktakis, P., Tsarouhas, K., Golokhvast, K. S., Rakitskii, V. N., Tutelyan, V. A., Hernandez, A. F., & Rezaee, R. (2017). Simulating

real-life exposures to uncover possible risks to human health: a proposed consensus for a novel methodological approach. *Human & Experimental Toxicology*, 36(6), 554–564.

Vaccher, V., Lopez, M. E., Castaño, A., Mol, H., Haji-Abbas-Zarrabi, K., Bury, D., Koch, H. M., Dvorakova, D., Hajslova, J., Nübler, S., Kaur Sakhi, A., Thomsen, C., Vorkamp, K., Göen, T., & Antignac, J. P. (2022). European interlaboratory comparison investigations (ICI) and external quality assurance schemes (EQUAS) for the analysis of bisphenol A, S and F in human urine: Results from the HBM4EU project. *Environmental Research*, 210(February). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112933>

Van Midwoud, P. M., Janse, A., Merema, M. T., Groothuis, G. M. M., & Verpoorte, E. (2012). Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Analytical Chemistry*, 84(9), 3938–3944. <https://doi.org/10.1021/ac300771z>

van Pomeran, M., Brun, N. R., Peijnenburg, W. J. G. M., & Vijver, M. G. (2017). Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. *Aquatic Toxicology*, 190, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.017>

Vandenberg, L. N. (2014). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: Bisphenol a as a case study. *Dose-Response*, 12(2), 259–276. <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-020.Vandenberg>

Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J. R., & Schoenfelder, G. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate

- widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118(8), 1055–1070. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24(2), 139–177. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2007.07.010>
- Vandenberg, L. N., Hunt, P. A., & Gore, A. C. (2019). Endocrine disruptors and the future of toxicology testing — lessons from CLARITY–BPA. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(6), 366–374. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0173-y>
- Vandenberg, L. N., Hunt, P. A., Myers, J. P., & Vom Saal, F. S. (2013). Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions. *Reviews on Environmental Health*, 28(1), 37–58.
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-a and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, 30(1), 75–95. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0021>
- Vecchiotti, G., Colafarina, S., Aloisi, M., Zarivi, O., Di Carlo, P., & Poma, A. (2021). Genotoxicity and oxidative stress induction by polystyrene nanoparticles in the colorectal cancer cell line HCT116. *PLoS ONE*, 16(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255120>
- Velzeboer, I., Kwadijk, C. J. A. F., & Koelmans, A. A. (2014). Strong sorption of PCBs to nanoplastics, microplastics, carbon nanotubes, and fullerenes. *Environmental Science and Technology*, 48(9), 4869–4876. <https://doi.org/10.1021/es405721v>

- Verla, A. W., Enyoh, C. E., Verla, E. N., & Nwarnorh, K. O. (2019). Microplastic–toxic chemical interaction: a review study on quantified levels, mechanism and implication. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1–30. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1352-0>
- Vianello, Alvise, Rasmus Lund Jensen, Li Liu, and Jes Vollertsen. 2019. “Simulating Human Exposure to Indoor Airborne Microplastics Using a Breathing Thermal Manikin.” *Scientific Reports* 9(1): 1–11. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-45054-w>.
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*, 15(10), 1281–1287. <https://doi.org/10.1021/tx025548t>
- Wahl, A., Le Juge, C., Davranche, M., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., & Gigault, J. (2021). Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris. *Chemosphere*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127784>
- Walczak, A. P., Kramer, E., Hendriksen, P. J. M., Helsdingen, R., Van Der Zande, M., Rietjens, I. M. C. M., & Bouwmeester, H. (2015). In vitro gastrointestinal digestion increases the translocation of polystyrene nanoparticles in an in vitro intestinal co-culture model. *Nanotoxicology*, 9(7), 886–894. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.988664>
- Wang, H., Jiang, L., Gu, S., & Wang, X. (2021). Migration of bisphenol A from polyvinyl chloride plastics to solvents of different polarities and packaged food in China. *Packaging Technology and Science*, 34(2), 127–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pts.2545>
- Wang, Q., Bai, J., Ning, B., Fan, L., Sun, T., Fang, Y., Wu, J., Li, S., Duan, C., Zhang, Y., Liang, J., & Gao, Z. (2020). Effects of bisphenol A and nanoscale and microscale

- polystyrene plastic exposure on particle uptake and toxicity in human Caco-2 cells. *Chemosphere*, 254, 126788. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.126788>
- Wang, T., Yu, C., Chu, Q., Wang, F., Lan, T., & Wang, J. (2020). Adsorption behavior and mechanism of five pesticides on microplastics from agricultural polyethylene films. *Chemosphere*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125491>
- Wang, X., Nag, R., Brunton, N. P., Siddique, M. A. B., Harrison, S. M., Monahan, F. J., & Cummins, E. (2022). Human health risk assessment of bisphenol A (BPA) through meat products. *Environmental Research*, 213(May), 113734. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113734>
- Wang, Y., Rui, M., Nie, Y., & Lu, G. (2018). Influence of gastrointestinal tract on metabolism of bisphenol A as determined by in vitro simulated system. *Journal of Hazardous Materials*, 355, 111–118. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2018.05.011>
- Wang, Yi, Jian Huang, Fengxiao Zhu, and Shaoda Zhou. 2021. “Airborne Microplastics: A Review on the Occurrence, Migration and Risks to Humans.” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 107(4): 657–64. <https://doi.org/10,1007/s00128-021-03180-0>.
- Welshons, W. V, Nagel, S. C., & vom Saal, F. S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147(6), s56–s69.
- (WHO), W. H. O. (2000). WHO—Toluene: Air quality guidelines. *Air Qual Guidel*, 2(7), 1–20
- Wilson, A. P. (2000). Cytotoxicity and viability assays. *Animal Cell Culture: A Practical*

*Approach*, 1, 175–219.

Wilson, J., Berntsen, H. F., Zimmer, K. E., Frizzell, C., Verhaegen, S., Ropstad, E., & Connolly, L. (2016). Effects of defined mixtures of persistent organic pollutants (POPs) on multiple cellular responses in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2, using high content analysis screening. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 294, 21–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.001>

Wright, Stephanie L, and Frank J Kelly. 2017. “Plastic and Human Health: A Micro Issue?” *Environmental Science and Technology* 51(12): 6634–47.

Wu, B., Wu, X., Liu, S., Wang, Z., & Chen, L. (2019). Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells. *Chemosphere*, 221, 333–341. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.01.056>

Wu, D., Feng, Y., Wang, R., Jiang, J., Guan, Q., Yang, X., Wei, H., Xia, Y., & Luo, Y. (2022). Pigment microparticles and microplastics found in human thrombi based on Raman spectral evidence. *Journal of Advanced Research*, 49, 141–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.09.004>

Wu, Panfeng et al. 2019. “Environmental Occurrences, Fate, and Impacts of Microplastics.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 184: 109612.

Wusch, J. R. (2000). *Polystyrene synthesis production and application* (Vol. 10). Shawbury, Shrewsbury, United Kingston: Rapra Technology LDD. Obtido em 22 de Agosto de 2023, de [https://books.google.pt/books?id=9Oal8DG\\_7GAC&lpg=PA5&ots=8nPH1NSynh&lr&hl=pt-PT&pg=PA5#v=onepage&q&f=true](https://books.google.pt/books?id=9Oal8DG_7GAC&lpg=PA5&ots=8nPH1NSynh&lr&hl=pt-PT&pg=PA5#v=onepage&q&f=true)

- Wypych, G. (2012). *Handbook of Polymers*. Toronto,, Canadá: ChemTec Publishing.
- Wypych, G. (2012). SBC Styrene-butadiene block copolymer. *Handbook of Polymers*. 637-640.
- Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2008). Cationic Polystyrene Nanosphere. *ACS Nano*, 2(1), 85–96.
- Xu, D., Ma, Y., Han, X., & Chen, Y. (2021). Systematic toxicity evaluation of polystyrene nanoplastics on mice and molecular mechanism investigation about their internalization into Caco-2 cells. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 126092. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.126092>
- Xu, M., Halimu, G., Zhang, Q., Song, Y., Fu, X., Li, Y., Li, Y., & Zhang, H. (2019). Internalization and toxicity: A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell. *Science of The Total Environment*, 694, 133794. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.133794>
- Yang, D., Shi, H., Li, L., Li, J., Jabeen, K., & Kolandhasamy, P. (2015). Microplastic Pollution in Table Salts from China. *Environmental Science and Technology*, 49(22), 13622–13627. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03163>
- Yang, Meng, and Wen-Xiong Wang. 2022. “Differential Cascading Cellular and Subcellular Toxicity Induced by Two Sizes of Nanoplastics.” *Science of The Total Environment* 829: 154593. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969722016862> (November 15,
- Yang, S., Cheng, Y., Chen, Z., Liu, T., Yin, L., Pu, Y., & Liang, G. (2021). In vitro evaluation of

nanoplastics using human lung epithelial cells, microarray analysis and co-culture model.

*Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112837.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112837>

Yang, Zhigang et al. 2022. "Polystyrene Microplastics Increase Pb Bioaccumulation and Health Damage in the Chinese Mitten Crab *Eriocheir Sinensis*." *Science of The Total Environment* 829: 154586.

Yang, Y., Liu, G., Song, W., Ye, C., Lin, H., Li, Z., & Liu, W. (2019). Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environment International*, 123(1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.061>

Yang, Y., Xie, E., Du, Z., Peng, Z., Han, Z., Li, L., Zhao, R., Qin, Y., Xue, M., Li, F., Hua, K., & Yang, X. (2023). Detection of Various Microplastics in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *Environmental Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c07179>

Yee, M. S. L., Hii, L. W., Looi, C. K., Lim, W. M., Wong, S. F., Kok, Y. Y., Tan, B. K., Wong, C. Y., & Leong, C. O. (2021). Impact of microplastics and Yee, M. S. L., Hii, L. W., Looi, C. K., Lim, W. M., Wong, S. F., Kok, Y. Y., Tan, B. K., Wong, C. Y., & Leong, C. O. (2021). Impact of microplastics and nanoplastics on human health. *Nanomaterials*, 11(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nano11020496>

Yeh, P. J., Hegreness, M. J., Aiden, A. P., & Kishony, R. (2009). Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 7(6), 460–466.

Yin, H., Too, H. P., & Chow, G. M. (2005). The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite. *Biomaterials*, 26(29), 5818–5826.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.036>

- Yu, F., Jin, F., Cong, Y., Lou, Y., Li, Z., Li, R., Ding, B., Wang, Y., Chen, J., & Wang, J. (2023). Bisphenol A decreases the developmental toxicity and histopathological alterations caused by polystyrene nanoplastics in developing marine medaka *Oryzias melastigma*. *Chemosphere*, 336(May), 139174. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139174>
- Zettler, E. R., Mincer, T. J., & Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the “plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science and Technology*, 47(13), 7137–7146. <https://doi.org/10.1021/es401288x>
- Zhang, H., Shi, J., Liu, X., Zhan, X., Dang, J., & Bo, T. (2014). Occurrence of free estrogens, conjugated estrogens, and bisphenol A in fresh livestock excreta and their removal by composting in North China. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(16), 9939–9947. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3002-9>
- Zhang, Qun et al. 2020. “A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: Direct Human Exposure.” *Environmental Science and Technology* 54(7): 3740–51.
- Zhang, Yu Xi et al. 2022. “Bioaccumulation of Differently-Sized Polystyrene Nanoplastics by Human Lung and Intestine Cells.” *Journal of Hazardous Materials* 439: 129585.
- Zhang, X. H., Zhang, X., Wang, X. C., Jin, L. F., Yang, Z. P., Jiang, C. X., Chen, Q., Ren, X. Bin, Cao, J. Z., Wang, Q., & Zhu, Y. M. (2011). Chronic occupational exposure to hexavalent chromium causes DNA damage in electroplating workers. *BMC Public Health*, 11(Vi). <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-224>

- Zhang, Y., Lu, J., Wu, J., Wang, J., & Luo, Y. (2020). Potential risks of microplastics combined with superbugs: Enrichment of antibiotic resistant bacteria on the surface of microplastics in mariculture system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187(October 2019), 109852. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109852>
- Zhao, Z., Qu, W., Wang, K., Chen, S., Zhang, L., Wu, D., & Chen, Z. (2019). Bisphenol A inhibits mucin 2 secretion in intestinal goblet cells through mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 111(January), 901–908. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.007>
- Zhao, Xizhen et al. 2022. "Polystyrene Nanoplastics Demonstrate High Structural Stability in Vivo: A Comparative Study with Silica Nanoparticles via SERS Tag Labeling." *Chemosphere* 300: 134567.
- Zheng, Q., Cui, L., Liao, H., Junaid, M., Li, Z., Liu, S., Gao, D., Zheng, Y., Lu, S., Qiu, J., & Wang, J. (2023). Combined exposure to polystyrene nanoplastics and bisphenol A induces hepato- and intestinal-toxicity and disturbs gut microbiota in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Science of the Total Environment*, 891(April), 164319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164319>
- Zhu, X., Qiang, L., Shi, H., & Cheng, J. (2020). Bioaccumulation of microplastics and its in vivo interactions with trace metals in edible oysters. *Marine Pollution Bulletin*, 154(September 2019), 111079. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111079>