

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

Perfil molecular e metabólico de exposição *in vitro* individual e combinada a nanoplásticos e bisfenol A avaliados por FTIR

Daniela Branco Tomás

**Orientadores:**

Professora Doutora Carina Ladeira - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

Professora Doutora Cecília R.C. Calado – Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2024

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

Perfil molecular e metabólico de exposição *in vitro* individual e combinada a nanoplásticos e bisfenol A avaliados por FTIR

Daniela Branco Tomás

**Orientadores:**

Professora Doutora Carina Ladeira - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

Professora Doutora Cecília R.C. Calado – Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL)

**Júri:**

Presidente – Professora Doutora Edna Soraia Ribeiro - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

Arguente – Professor Doutor Luís Miguel Minhalma - Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2024



Mestrado em  
Tecnologias  
Clínico-  
Laboratoriais

Perfil  
molecular e  
metabólico  
de exposição  
*in vitro*  
individual e  
combinada a  
nanoplástico  
s e bisfenol A  
avaliados  
por FTIR

Daniela Branco  
Tomás

**2024**

## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar a minha sincera gratidão às pessoas que tornaram esta dissertação possível.

Primeiramente, agradeço às minhas orientadoras, Professora Doutora Carina Ladeira por me deixar integrar neste projeto, e à Professora Doutora Cecília Calado, pela sua assistência à espectroscopia FTIR, que foi inestimável e que recorri frequentemente à sua ajuda, e pelos conselhos valiosos. Agradecer pela vossa orientação, paciência e incentivo que me ajudaram a alcançar o meu melhor e a superar os desafios ao longo do caminho.

Agradeço igualmente à Cristiana Von Rekowski e ao Tiago Fonseca pela ajuda na parte prática do FTIR e pelas dicas na análise dos resultados, foram de grande valor para este estudo.

Quero também agradecer às minhas melhores amigas, Bárbara Terezo e Mafalda Chumbinho, que partilharam comigo as mesmas preocupações, dúvidas e esforço. O vosso apoio e companhia foram essenciais para manter-me motivada e confiante ao longo deste percurso.

Por fim, um agradecimento especial aos meus pais, pelo apoio incondicional, encorajamento e amor que me deram força necessária para continuar e completar este trabalho. Sem a vossa presença constante e apoio, esta conquista não teria sido possível.

Parte deste trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro dos projetos R-DICIP (IPL/IDI&CA2024/R-DICIP\_ISEL) e PLASCOGEN (IPL/IDICA2021/PLASCOGEN\_ESTeSL), ambos financiados pelo Instituto Politécnico de Lisboa e pelo projeto PREMO ([DSAIPA/DS/0117/2020](#)) financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

A todos, o meu mais sincero obrigado.

## Resumo

O uso excessivo de plástico tem gerado preocupações sobre a exposição a nanoplásticos (NPs) e bisfenol A (BPA) e os seus impactos na saúde humana. Evidências científicas mostram que estes poluentes podem acumular-se no intestino e entrar no organismo. A capacidade de induzir genotoxicidade do BPA tem sido amplamente estudado, e a sua exposição pode promover processos inflamatórios e formação de micronúcleos. Os efeitos dos NPs nas células e tecidos de mamíferos permanecem pouco claros. A avaliação dos efeitos citogenéticos de agentes genotóxicos é geralmente feita através do ensaio dos micronúcleos por bloqueio de citocinese (CBMN), no entanto, devido à laboriosidade e complexidade da técnica, o presente trabalho teve como objetivo avaliar um novo método para detetar os efeitos *in vitro* dos NPs e BPA, e que seja sensível, mas mais simples e rápido em relação ao CBMN.

No presente trabalho foram avaliadas a exposição individual e combinada de BPA e nanopartículas de poliestireno (PS-NPs), na linha celular gástrica GP202. Foram analisados por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) os meios de cultura designado por 0h após exposição, os meios de cultura 24h após finda a exposição e as células 24h após finda a exposição. Por CBMN, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas da exposição a NPs e BPA em relação ao controlo, observando-se uma tendência de aumento de micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (NBPs) e protusões nucleares (NBUDs), na exposição combinada de PS-NPs e BPA. Foi efetuada uma análise univariada de várias bandas espectrais FTIR, após diversos pré-processamentos espectrais, como correção de linha de base, correção de linha de base com normalização, 2ª derivada e 2ª derivada com normalização. Foram observadas várias bandas estatisticamente diferentes, com significância a 1%, 5% e 10%, quer em comparações múltiplas entre as condições de exposição, quer entre comparações entre pares de condições de exposição. Estas alterações foram observadas dos espectros obtidos dos meios de cultura e diretamente das células. O espectro de FTIR representa o perfil molecular do meio de cultura e das células, resultado do estado metabólico das células. Desta forma, a espectroscopia de FTIR apresenta-se como uma técnica bastante sensível, rápida e simples de implementar para detetar alterações metabólicas nas linhas celulares gástricas quando expostas a NPs e BPA, mesmo em condições em que não há alterações genotóxicas, tal como detetado por CBMN.

**Palavras-chave:** Espectroscopia FTIR, Nanoplásticos, Bisfenol A, Genotoxicidade, Ensaio CBMN

## **Abstract**

The excessive use of plastic has raised concerns about exposure to nanoplastics (NPs) and bisphenol A (BPA) and their impacts on human health. Scientific evidence shows that these pollutants can accumulate in the intestine and enter the body. The genotoxicity-inducing ability of BPA has been extensively studied, and its exposure can promote inflammatory processes and micronucleus formation. The effects of NPs on mammalian cells and tissues remain unclear. The evaluation of the cytogenetic effects of genotoxic agents is generally performed using the micronucleus assay with cytochalasin B (CBMN). However, due to the laboriousness and complexity of this technique, the present study aimed to assess a new method for detecting the in vitro effects of NPs and BPA that is sensitive yet simpler and faster compared to CBMN.

In this study, the individual and combined exposure of BPA and polystyrene nanoparticles (PS-NPs) was evaluated using the GP202 gastric cell line. The culture media designated as 0h after exposure, the culture media 24h after the exposure, and the cells 24h after the exposure were analyzed by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. CBMN did not reveal statistically significant differences in exposure to NPs and BPA compared to the control, though a trend towards an increase in micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NBP), and nuclear buds (NBUDs) was observed with combined exposure to PS-NPs and BPA. A univariate analysis of several FTIR spectral bands was performed after various spectral preprocessing methods, including baseline correction, baseline correction with normalization, 2nd derivative, and 2nd derivative with normalization. Several statistically different bands were observed, with significance at 1%, 5%, and 10%, both in multiple comparisons between exposure conditions and pairwise comparisons between exposure conditions. These changes were noted in spectra obtained from culture media and directly from cells. The FTIR spectrum represents the molecular profile of the culture media and cells, reflecting the metabolic state of the cells. Thus, FTIR spectroscopy proves to be a highly sensitive, rapid, and straightforward technique for detecting metabolic changes in gastric cell lines when exposed to NPs and BPA, even in conditions where no genotoxic changes are detected, as observed by CBMN.

**Keywords:** FTIR spectroscopy, Nanoplastics, Bisphenol A, Genotoxicity, CBMN assay

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
1. Introdução.....	13
1.1. A presença de plástico no ambiente.....	13
1.2. Potencial impacto dos nanoplásticos na saúde humana e ecossistemas.....	13
1.3. Potencial impacto do BPA na saúde humana e ecossistemas.....	14
1.4. Compreensão dos efeitos genotóxicos do NP e BPA.....	14
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo geral .....	15
2.2. Objetivos específicos .....	15
3. Revisão da Literatura.....	16
3.1. Nanoplásticos.....	16
3.1.1. Definição e caracterização.....	16
3.1.2. Exposição ambiental e humana aos nanoplásticos .....	17
3.1.3. Potencial tóxico das nanopartículas .....	18
3.2. Bisfenol A.....	20
3.2.1. Definição .....	20
3.2.2. Exposição ambiental e humana ao BPA.....	20
3.2.3. Toxicidade do BPA.....	21
3.3. Avaliação da genotoxicidade das substâncias químicas .....	22
3.3.1. Genotoxicidade .....	22
3.3.1.1. Ensaio dos micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN).....	23
3.4. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) .....	24
3.4.1. Vantagens .....	25
3.4.2. Aplicações.....	26
4. Materiais e Métodos .....	27
4.1. Tipo de estudo.....	27
4.2. Local do estudo.....	27
4.3. Variáveis.....	27
4.4. Soluções de BPA e NP testadas .....	27
4.5. Cultura celular .....	28
4.6. Avaliação da viabilidade celular e genotoxicidade pelo método convencional	29

4.7.	Avaliação de espectroscopia FTIR.....	29
4.7.1.	Análise do meio de cultura e <i>pellet</i> celular.....	30
4.7.2.	Análise univariada dos espectros FTIR.....	31
5.	Resultados e Discussão.....	32
5.1.	Impacto na viabilidade celular e genotoxicidade baseado no ensaio CBMN .	32
5.2.	Análise das bandas de espectros do meio de cultura.....	34
5.2.1.	Comparações múltiplas de bandas espectrais entre as 5 condições .....	36
5.2.2.	Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney.....	42
5.3.	Análise das bandas de espectros das células.....	44
5.3.1.	Comparações múltiplas de bandas espectrais entre as 5 condições .....	46
5.3.2.	Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney.....	49
6.	Conclusão.....	51
7.	Referências Bibliográficas.....	53

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Região do espectro infravermelho. Adaptado de Fadlemoula et al., 2022. ....	25
Tabela 5.1 - Avaliação da viabilidade celular após 24h de exposição individual de PS-NP (200ug/mL) e de BPA (1ng/mL) e combinada de 1ng/mL de BPA com 200µg/mL PS-NP. Os resultados foram obtidos de Brito4. ....	32
Tabela 5.2 - Avaliação dos biomarcadores genotóxicos MN, NPB e NBUD, em 500 células binucleadas observadas. Os valores médios e respetivos desvios padrões dos parâmetros avaliados foram obtidos de Brito4. ....	33
Tabela 5.3 - Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni a 5% e a 10% dos espectros das 24h, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes. ....	37
Tabela 5.4 - Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni a 5% e a 10% dos espectros das 44h, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes. ....	38
Tabela 5.5 - Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney a 1% dos espectros das 24h, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes. ....	42
Tabela 5.6 - Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney a 1% dos espectros das 44h, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes. ....	43
Tabela 5.7 - Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni a 5% e a 10% dos espectros das células, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes. ....	47
Tabela 5.8 - Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney a 1% dos espectros das células, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes. ....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1- Classificação do tamanho das partículas de plástico em relação a estruturas biológicas. Fonte: Kokalj et al., 2021. ....	16
Figura 3.2 - Formação de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas no bloqueio da citocinese. Fonte: Fenech M., 2020. ....	24
Figura 5.1- Representação dos biomarcadores genotóxicos dos controlos negativo (1), positivo (2) e da exposição combinada de BPA+PS-NP (3). ....	33
Figura 5.2 - Representação dos espectros de FTIR do meio de cultura sem pré-processamento (A); média dos espetros com correção à linha de base (B), correção à linha de base com normalização (C), 2ª derivada (E) e 2ª derivada com normalização (E- H). Vermelho – controlo, cinzento – BPA, amarelo – PS-NP, azul – BPA+NP, verde – colchicina. As setas indicam as bandas selecionadas para a análise estatística.....	35
Figura 5.3- Representação do gráfico de bigodes das bandas com maior número de pares estatisticamente diferentes observadas nas comparações múltiplas das 5 condições, baseadas no espectro de meio de cultura às 24h, com segunda derivada e normalização. ....	41
Figura 5.4 - Representação do gráfico de bigodes das bandas com maior número de pares estatisticamente diferentes observadas nas comparações múltiplas das 5 condições, baseadas no espectro de meio de cultura às 44h, com segunda derivada e normalização. ....	41
Figura 5.5 - Representação dos espectros de FTIR das células sem pré-processamento (A); média dos espetros com correção à linha de base (B), correção à linha de base com normalização (C), 2ª derivada (E) e 2ª derivada com normalização (E- H). Vermelho – controlo, cinzento – BPA, amarelo – NP, azul – BPA+NP, verde – colchicina. As setas indicam as bandas selecionadas para análise estatística.....	45
Figura 5.6 - Representação do gráfico de bigodes das bandas com maior número de pares estatisticamente diferentes observadas nas comparações múltiplas das 5 condições, baseadas no espectro das células, com segunda derivada. ....	49

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**2D** – Segunda derivada

**2D + UVN** – Segunda derivada com normalização

**AR** – Recetor de androgénio

**ATM** – Correção atmosférica

**BC** – Correção à linha de base

**BC + UVN** – Correção à linha de base com normalização

**BPA** – Bisfenol A

**CBMN** – Ensaio dos Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese

**CytoB** – Citocalasina B

**ECHA** – European Chemicals Agency

**EDC** – Desregulador endócrino

**EFSA** – European Food Safety Authority

**ER** – Recetor de estrogénio

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

**EU** – União Europeia

**FDA** – Food and Drug Administration

**FTIR** – Espetroscopia de infravermelho transformada de Fourier

**GI** – Trato gastrointestinal

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

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

**IDT** – Ingestão diária tolerável

**ISEL** – Escola Superior de Engenharia de Lisboa

**IV** – Radiação infravermelho

**MN** – Micronúcleos

**MNPs** – Micro-nanoplásticos

**MPs** – Microplásticos

**NBUD** – Protusões nucleares

**NPB** – Pontes nucleoplasmáticas

**NPs** – Nanoplásticos

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

**PS** – Poliestireno

**PS-NP** – Nanoplásticos de Poliestireno

**ROS** – Espécies reativas de oxigénio

**SI** – Microplaca de silício

**UVN** – Normalização de vetores unitários

## 1. Introdução

### 1.1. A presença de plástico no ambiente

Na atualidade, uma das grandes preocupações científicas centra-se na exposição ambiental a diversos produtos químicos considerados tóxicos e prejudiciais à saúde humana<sup>1</sup>. Um dos produtos que o meio ambiente mais se encontra exposto é ao plástico. Os produtos plásticos têm vindo a ser produzidos em taxas cada vez maiores, tornando a poluição de plásticos uma das mais importantes questões ambientais contemporâneas. O plástico é um material muito prático e duradouro, resistente à degradação, fácil de moldar e com baixíssimo custo de produção. A produção global anual de plástico é de cerca de 300 milhões de toneladas, aumentando mais de 20 vezes nos últimos 60 anos<sup>2</sup>.

Como o material plástico é muito resistente no ambiente natural, leva séculos para se decompor. A luz solar, o vento e as ondas quebram continuamente o plástico em partículas cada vez menores<sup>2</sup>. Na última década, estas pequenas partículas que surgem da decomposição do plástico, nomeadamente microplásticos (MPs) (tamanho < 5 mm) e nanoplásticos (NPs) (tamanho <1 µm), foram identificadas como uma ameaça global crescente, que pode afetar os ecossistemas, a biodiversidade e a saúde humana, após deteção de MPs no ar, frutos do mar, mel, e inclusive água potável<sup>3,4</sup>.

Os fragmentos de plástico ingeridos podem causar alterações no comportamento alimentar e reprodutivo. O seu efeito deve-se principalmente à libertação de diversos compostos e aditivos químicos, como bisfenol A (BPA), utilizados na produção do material plástico que são perigosos para os seres humanos, que podem ser expostos de forma ocupacional através do uso subsequente do produto ou devido à transferência para os produtos a partir das embalagens de plástico<sup>2,5</sup>.

### 1.2. Potencial impacto dos nanoplásticos na saúde humana e ecossistemas

Os nanoplásticos são pequenas partículas resultantes da degradação de materiais de plásticos maiores<sup>6,7</sup>. Nos últimos anos, estas partículas foram detetadas em ambientes aquáticos, em sedimentos, comida, e até mesmo nos tecidos humanos e animais<sup>8</sup>. Os NPs são incorporados em produtos específicos como por exemplo, em produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal e bioimagem<sup>6</sup>. Devido ao tamanho extremamente pequeno, podem acumular-se no meio ambiente durante anos, por isso são considerados mais prejudiciais que os microplásticos<sup>9</sup>.

A maioria das partículas encontradas no ambiente são de poliestireno (PS)<sup>10,11</sup>. Como têm uma maior área de superfície específica e maior permeabilidade<sup>8</sup>, os PS-NPs conseguem atravessar as barreiras biológicas e penetrar mais facilmente nas células<sup>9</sup>. Estudos de exposição *in vitro* e *in vivo* indicam que MPs e NPs são absorvidos pelo corpo humano e acumulam-se no lúmen intestinal, no qual podem atravessar e entrar na corrente sanguínea<sup>6</sup>. Através de vários estudos é demonstrado que a toxicidade dos MPs e NPs aumenta com a diminuição do seu tamanho<sup>12</sup> e por isso torna-se de extrema importância compreender os riscos dos NPs na saúde humana.

### 1.3. Potencial impacto do BPA na saúde humana e ecossistemas

O bisfenol A (BPA) é um aditivo químico comumente utilizado na produção de plásticos e está presente em numerosos objetos de uso diário, incluindo utensílios domésticos, material de escritório, equipamentos automóveis, brinquedos e muito mais<sup>13</sup>. Os produtos que contém BPA podem contactar com água potável, o que permite a transferência desta substância para a cadeia alimentar<sup>13</sup>.

Uma das grandes preocupações da exposição ao BPA é as suas propriedades químicas como desregulador endócrino. O BPA é um EDC bem conhecido com afinidade para se ligar aos recetores de estrogénio<sup>14</sup>, o que interfere com o funcionamento normal das hormonas<sup>15</sup>. A presença de BPA em amostras biológicas tem sido correlacionada com o aumento de anormalidades reprodutivas (abortos recorrentes) e genéticas (cariótipo embrionário anormal)<sup>16,17</sup>.

### 1.4. Compreensão dos efeitos genotóxicos do NP e BPA

A genotoxicidade é um aspeto crítico da avaliação da toxicidade dos NPs e BPA<sup>18</sup>. A capacidade do BPA de induzir genotoxicidade tem sido muito investigado em estudos *in vitro* como *in vivo*, e a sua exposição pode promover processos inflamatórios, induzir anomalias de cromossomas e formação de micronúcleos<sup>17,19</sup>. Já os efeitos dos MPs/NPs nas células e tecidos de mamíferos, particularmente humanos, permanecem pouco claros. Atualmente, os dados disponíveis que provém de modelos aquáticos *in vivo* ou estudos de cultura celular *in vitro*<sup>20</sup> demonstram que os MPs/NPs podem provocar alterações ao nível da mitocôndria<sup>9</sup>, podem alterar a barreira intestinal, induzir stresse oxidativo, que pode levar à desregulação génica<sup>4</sup>.

Nos estudos de biomonitorização humana o ensaio dos micronúcleos por bloqueio de citocinese (CBMN) é regularmente usado para detetar os efeitos citogenéticos após exposição a agentes genotóxicos<sup>21</sup>. Apesar de ser menos laborioso, dispendioso e demorado, o procedimento pode levar até 5 dias para ser concluído. O método ideal

para monitorização de rotina da genotoxicidade deve ser rápido, simples, económico, e com alta sensibilidade e especificidade. A espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR), associada a multivariada análise de dados, apresenta diversas características que podem permitir alcançar estes requisitos<sup>22</sup>. Como todas as frequências são medidas simultaneamente, o FTIR permite quantificar os constituintes e analisar alterações na composição bioquímica de uma amostra ao analisar a vibração molecular, conseguindo identificar mudanças associadas a um estado patológico<sup>23,24</sup>.

Assim, este estudo visa fornecer uma compreensão dos efeitos metabólicos dos nanoplásticos e da exposição ao BPA e avaliar a fiabilidade da espectroscopia FTIR como uma ferramenta para avaliação de genotoxicidade.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo avaliar a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) como um novo método de biomonitorização, através do estudo do impacto de duas substâncias tóxicas (NPs e BPA) no metabolismo celular na linha celular gástrica GP202, e que possa possibilitar a previsão do impacto genotóxico de forma simples, económica e de alto rendimento.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Quantificar os efeitos metabólicos da exposição individual e combinada a nanoplásticos e bisfenol A na linha celular GP202 através de espectroscopia FTIR;
- Comparar os resultados obtidos através de espectroscopia FTIR com os resultados de genotoxicidade obtidos previamente através do ensaio de CBMN.

### 3. Revisão da Literatura

#### 3.1. Nanoplásticos

##### 3.1.1. Definição e caracterização

A poluição de plástico na água e em terra continua a aumentar e a ameaçar a saúde dos seres humanos e dos ecossistemas. Atualmente, existem grandes preocupações sobre os pequenos fragmentos produzidos a partir da degradação de grandes detritos de plástico<sup>8</sup>. Os plásticos podem ser degradados por via microbiana, por radiação ultravioleta ou por dano físico<sup>25</sup>. Os fragmentos resultantes da sua degradação podem ser classificados com base no seu diâmetro como macroplásticos (> 5 mm), microplásticos (MPs) (< 5mm) e nanoplásticos (NPs) (< 1  $\mu\text{m}$ )<sup>8,26,27</sup>(figura 3.1).

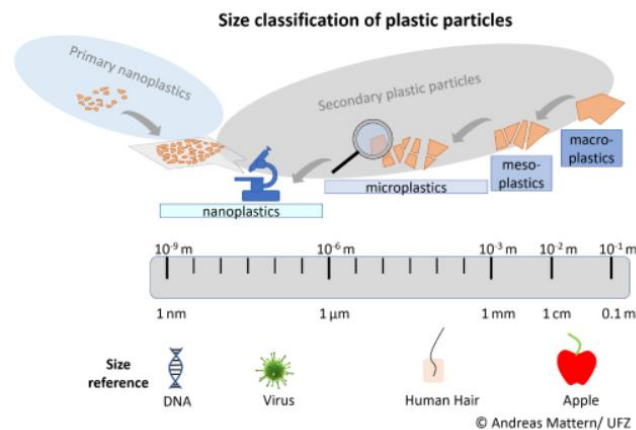


Figura 3.1- Classificação do tamanho das partículas de plástico em relação a estruturas biológicas. Fonte: Kokalj et al., 2021.

Os macroplásticos consistem numa grande variedade de plásticos, desde pequenos fragmentos de plástico até objetos grandes, como naufrágios e sacos de arrasto. Os macroplásticos são frequentemente objetos reconhecíveis, mas alguns macroplásticos também são fragmentos de plástico não identificáveis<sup>28</sup>. A *Ocean Cleanup* diferencia entre mesoplásticos (0,5 – 5 cm), macroplásticos (5 – 50 cm) e megaplásticos (>50 cm)<sup>29</sup>. Os microplásticos são definidos como partículas de polímero artificial com tamanho menor ou igual a 5 mm. Eles podem ser produzidos através da desintegração estrutural de resíduos de produtos de plástico e libertados no meio ambiente. Posteriormente, as partículas de microplástico decompõem-se em nanoplásticos<sup>6</sup>. Os nanoplásticos são pequenas partículas sólidas de polímeros naturais sintéticos ou fortemente modificados, com tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$ , que advém da degradação dos plásticos quando estes vão para o ambiente<sup>30</sup>.

Independentemente do seu tamanho, os MPs e os NPs podem ser divididos em micro-nanoplásticos (MNPs) primários e secundários. Os MNPs primários são fabricados em tamanho microscópico (microesferas, fibras) para serem usados, por exemplo, em dispositivos médicos ou mesmo em produtos de cuidados pessoais, como sabonetes e cosméticos. Já os MNPs secundários são resultado da degradação de partículas de plástico maiores em pedaços menores que podem ser detetados em vários nichos do ambiente, mas principalmente nos oceanos. Hoje em dia, somos confrontados diariamente com MNPs e, os seus efeitos no desenvolvimento e na saúde do organismo, bem como no ambiente, ainda não são claros. Claramente, os NPs podem ter vários efeitos biológicos e/ou tóxicos diferentes, dependendo do tipo e tamanho das partículas, bem como do meio ambiental e do próprio organismo afetado<sup>20</sup>.

De entre os diferentes tipos de plástico mais comumente usados (polietileno, polipropileno, poliestireno e cloreto de polivinilo), na vida diária, o poliestireno (PS) é um dos mais utilizados, com mais de 23 milhões de toneladas por ano, tornando-o um dos constituintes mais significativos dos NPs<sup>31,32</sup>. É o polímero que mais se encontra no ambiente, sendo detetado em amostras de água costeira, e por isso tem sido amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos marinhos de MPs e NPs<sup>32,33</sup>.

### 3.1.2. Exposição ambiental e humana aos nanoplásticos

Os NPs são encontrados em todo o planeta: nos oceanos e no ambiente terrestre, são trazidos pelo vento, por sedimentos presentes no solo, de onde viajam facilmente, e podem terminar em aquíferos e, por fim, acabam por contaminar a água potável<sup>34</sup>. Devido à sua estrutura leve e resistente, são capazes de permanecer dispersos na água e podem ser ingeridos pela fauna marinha e assim, possivelmente, entrar na cadeia alimentar<sup>35</sup>. Os NPs podem também ser encontrados na atmosfera por formarem partículas de aerossóis através do vento e ondas do mar<sup>12</sup>. Podem ser absorvidos nas nuvens, e pelo processo de precipitação conseguem ser transportados para diferentes ambientes naturais<sup>4,12</sup>. Devido a esta dispersão das nanopartículas, pode resultar numa bioacumulação nos organismos e nos alimentos<sup>4</sup>.

O ser humano encontra-se sujeito a uma exposição de longo prazo (quase toda a vida) às nanopartículas em baixas concentrações, podendo entrar em contacto através de inalação, ingestão e contacto direto<sup>6</sup>. A ingestão oral é uma das rotas comuns pela qual o ser humano é exposto a NPs<sup>6</sup>. A utilização de plástico nas redes de água potável leva a uma alta exposição para os consumidores de água. Além disso, os NPs podem ser absorvidos por organismos inferiores na cadeia alimentar, que são posteriormente ingeridos por organismos superiores e, eventualmente, pelos seres humanos<sup>6</sup>. O maior

risco de exposição está no consumo de frutos do mar, sais marinhos e águas contaminadas<sup>9</sup>.

O desgaste dos pneus dos automóveis pode gerar MPs ou NPs, que são libertados no ar, tornando-se uma potencial fonte de exposição por inalação<sup>6</sup>. O fabrico das microfibras têxteis sintéticas (como náilon, poliéster e acrílico) também são uma fonte para a poluição de MPs, porque degradam-se muito lentamente e persistem enquanto poluentes<sup>36</sup>, e originam-se principalmente da lavagem doméstica<sup>6</sup>. Estima-se que 1.900 microfibras sintéticas sejam libertadas durante um ciclo de lavagem<sup>34</sup>. A exposição dérmica também contribui para a exposição humana aos NPs, especialmente para partículas menores que 40 nm, que conseguem passar a barreira da pele. É relevante para quem entra em contacto com itens contaminados com NPs, como por exemplo produtos pessoais<sup>9</sup>.

A legislação relativa aos MPs/NPs é inegavelmente importante para reduzir e mitigar o impacto causado por estes materiais nos ecossistemas. Em 2019, a *European Chemicals Agency* (ECHA) apresentou uma proposta para restringir a adição intencional de micropartículas de polímeros sintéticos a produtos de limpeza, cosméticos, produtos de higiene pessoal e produtos de uso único<sup>37</sup>. Salientou que os MPs inferiores a 100 nm que sejam possíveis de ser caracterizados de forma fiável não devem ser adicionados intencionalmente aos produtos<sup>38</sup>. A *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) proibiu, em 2015, a fabricação, o acondicionamento e distribuição de cosméticos e produtos de higiene pessoal que contenham microesferas menores ou iguais a 5 mm<sup>37</sup>. A FDA recomenda que a contaminação química aceitável estimada do plástico reciclado seja inferior a 1,5 µg/pessoa/dia<sup>39</sup>.

### 3.1.3. Potencial tóxico das nanopartículas

Os NPs têm uma grande área superficial específica o que permite que os contaminantes orgânicos e inorgânicos podem associar-se à sua superfície. São altamente polidispersos e de natureza heterogénea<sup>40</sup>. Foi reconhecido que os NPs são absorvidos pelas células durante o processo de endocitose e então causar riscos à saúde dos seres humanos<sup>12</sup>.

Vários estudos relataram que os NPs têm capacidade de adsorver vários contaminantes orgânicos, o que os torna mais reativos e, devido à sua hidrofobicidade, podem alcançar locais mais remotos e penetrar mais facilmente nas células<sup>8,41</sup>. São capazes de atravessar as barreiras biológicas, incluindo as do intestino, pulmões, cérebro e placenta. Uma vez que se infiltram num ambiente biológico, a superfície dos NPs é

rapidamente revestida com uma camada de biomoléculas, como proteínas e lípidos<sup>9,42</sup>, e esta interação desencadeia uma mudança nas propriedades físico-químicas dos NPs, que pode influenciar o seu comportamento e potencialmente intensificar as implicações relacionadas à saúde<sup>9</sup>.

Estudos envolvendo exposição a nanoplasticos de poliestireno (PS-NPs), descobriram que pode levar a uma série de efeitos toxicológicos, incluindo anormalidades reprodutivas<sup>43</sup>, stresse oxidativo e disfunção do trato gastrointestinal(GI)<sup>44</sup>, aumento da mortalidade, inibição e distúrbios do crescimento<sup>9,11</sup>. Em estudos *in vivo* de organismos aquáticos, os MPs/NPs foram encontrados nas fezes, guelras, pele, músculos e sistema circulatório, causando desregulação endócrina, inflamação dos tecidos, alterações comportamentais e crescimento reduzido<sup>37</sup>. Após uma exposição de PS-NP por 120h, foi relatado que os embriões de peixe acumulam estas partículas em todos os seus órgãos e são eliminados quando a exposição termina<sup>37,45</sup>. Outros estudos em peixes demonstraram neurotoxicidade, inflamação ou danos no intestino e alterações neurológicas, além de acumulação de NPs nos órgãos<sup>37</sup>. Para além dos peixes, os nematodes e pulgas de água também têm sido utilizados para avaliar a toxicidade das nanopartículas. As pulgas de água mostraram alterações no crescimento e reprodução quando expostas cronicamente a 0,1 mg/L de 20-200 nm PS-NP<sup>46</sup>. Os nematodes mostraram tamanho reduzido dos filhos, danos no desenvolvimento das gónadas, inibição da reprodução e alteração da locomoção quando expostos a 25-100 nm de PS-NP<sup>37</sup>.

Através de estudos *in vitro*, a avaliação de MPs/NPs em concentrações de 10 mg/L pode induzir stresse oxidativo nas células quando expostas por 24 a 48 horas<sup>37,47</sup>. Outros trabalhos relataram danos à membrana mitocondrial, aumento da apoptose, ativação da autofagia e respostas inflamatórias<sup>37</sup>.

O potencial dano causado pelo MPs/NPs deve-se às próprias partículas e às substâncias com efeitos adversos que carregam na sua superfície que podem causar efeito sinérgico<sup>37</sup>. Estima-se que 1 g de NPs pode transportar de 1 a 10.000 ng dessas substâncias tóxicas<sup>37,48</sup>. Levando em consideração o impacto pela presença de MPs/NPs, eles podem ficar armazenados no intestino dos animais e obstruir e alterar a microbiota, causar desequilíbrios, inflamações, úlceras e até aumentar o risco de cancro<sup>37</sup>.

## 3.2. Bisfenol A

### 3.2.1. Definição

O bisfenol A (BPA, 4,4'-isopropylidenediphenol) é um sólido cristalino incolor que pertence à família dos compostos orgânicos, de fórmula química  $C_{15}H_{16}O_2$ <sup>49</sup>. Foi sintetizado pela primeira vez em 1891, pela combinação de fenol com acetona na presença de um catalisador ácido<sup>49</sup>. Atualmente, é um produto químico produzido em grandes quantidades para uso na produção de plásticos de policarbonato<sup>50</sup> e resinas epoxídicas usadas em quase todo o setor industrial<sup>51</sup>. É amplamente utilizado na produção de produtos de consumo, incluindo recipientes para alimentos, objetos médicos, utensílios domésticos, brinquedos, material de escritório, equipamentos de automóveis, canos de água e muito mais<sup>16,52</sup>. Como tem sido o principal componente utilizado no plástico, a crescente demanda por produtos contendo BPA nas últimas décadas resultou numa extensa contaminação ambiental e exposição humana quase contínua<sup>16</sup>.

### 3.2.2. Exposição ambiental e humana ao BPA

O BPA está presente no meio ambiente como resultado da libertação direta durante o processamento e manuseamento. O ser humano encontra-se exposto ao BPA através da ingestão alimentar (partículas transferidas ou filtradas de embalagens que entram em contacto com alimentos), por meios ambientais (ar ambiental, ar interno, água potável, solo e poeira) e através do uso de produtos de consumo<sup>52,53</sup>. Dada a tendência das crianças de colocarem objetos inadequados na boca, existe um potencial de estas serem expostas ao BPA através da boca ou da ingestão acidental de produtos de consumo<sup>53</sup>. Desta forma, a ingestão alimentar é responsável pela maior parte de exposição humana diária<sup>54</sup>.

Como resposta a uma avaliação de risco melhorada do BPA e dos seus efeitos indesejados à saúde, em abril de 2023, a *European Food Safety Authority* (EFSA) reduziu a ingestão diária tolerável (IDT) para 0,2 ng/kg/pc/dia, tornando a IDT cerca de 20.000 vezes menor do que antes<sup>55</sup>.

Em 2018, a União Europeia (UE) emitiu um parecer em relação à utilização de BPA, e proibiu a aplicação deste no fabrico de biberões de policarbonato para latentes. No entanto, a utilização de BPA como monómero na produção de materiais e objetos de matéria plástica é autorizada pelo Regulamento (UE) nº 10/2011 da Comissão Europeia. A autorização está sujeita a um limite de migração específico (LME) de 0,6 mg de BPA

por quilograma de alimento (mg/kg) baseado numa anterior avaliação realizada pelo Comité Científico da Alimentação Humana<sup>56</sup>.

A ECHA classifica o BPA como uma substância que causa efeito tóxico na nossa capacidade reprodutiva; causa sérios danos aos olhos; pode causar irritação respiratória; alergias cutâneas e muito tóxico para a vida aquática com efeitos de longa duração. O seu uso como substância isolada e em misturas em produtos destinados ao consumo foi restringido na UE desde março de 2018. Em 2020, foi restringida a utilização em papel térmico<sup>57</sup>.

### 3.2.3. Toxicidade do BPA

Na década de 1930 os cientistas desenvolveram o BPA como um estrogénio sintético e notaram a possibilidade de propriedades cancerígenas. A partir de meados da década de 1990, numerosos estudos determinaram que tanto a exposição de alto nível como de baixo nível ao BPA podem afetar negativamente a reprodução e o desenvolvimento dos animais, interferindo nos seus sistemas endócrinos<sup>49</sup>. Foi verificado o efeito tóxico do BPA e dos seus produtos químicos<sup>58</sup>, demonstrando ter efeitos como desregulador endócrino ao interagir com vários recetores biológicos, como recetor de estrogénio (ER), recetor de androgénio (AR) e recetor da hormona tiroideia<sup>59</sup>. Estas interações podem resultar consequentemente em riscos para a saúde do sistema reprodutivo, do sistema nervoso, da função metabólica, da função imune, bem como para o crescimento e desenvolvimento da descendência<sup>14</sup>.

Foi demonstrando que ao agir como desregulador endócrino, pode atuar como agonista ou mimetizar a hormona natural. Devido a isso, pode ligar-se e ativar vários recetores hormonais que pode afetar significativamente as concentrações das hormonas, o seu transporte, a sua síntese, metabolismo ou eliminação<sup>14</sup>. Alguns estudos que avaliam a concentração de BPA e o seu impacto na fertilidade, detetaram a sua presença na placenta, no soro do feto e com concentração maior no líquido amniótico a meio da gravidez<sup>60</sup>. Estudos de exposição a animais demonstraram uma redução da fertilidade expondo o útero e ovários<sup>61</sup>.

Os estudos realizados em organismos subaquáticos demonstraram que a principal via de infiltração do BPA é através do trato digestivo e que prejudica a função da barreira intestinal e pode promover processos inflamatórios no estômago e intestino<sup>4,13</sup>. Sabe-se também que doses relativamente baixas de BPA podem causar alterações nas estruturas nervosas que irrigam o trato GI<sup>13</sup>.

Para além dos efeitos mediados por recetores, sabe-se que o BPA danifica o DNA, contribuindo para a carcinogénese e a teratogénese<sup>16</sup>. A literatura mostra que o BPA pode induzir aberrações cromossómicas e formação de adutos de DNA, testado em células embrionárias de hamster, assim como formação de micronúcleos e aneuploidias<sup>17</sup>. O dano ao DNA induzido pelo BPA também está associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), levando ao stresse oxidativo. As alterações no DNA também podem ocorrer a partir de mudanças epigenéticas. A exposição a BPA pode alterar os padrões de metilação do DNA, alterando o epigenoma<sup>16</sup>. Foi demonstrado que pode afetar a histona metiltransferase EZH2 e a estrutura da cromatina. O BPA também pode acumular-se nas mitocôndrias das células e induzir a disfunção mitocondrial, podendo alterar o potencial da membrana<sup>16</sup>.

### 3.3. Avaliação da genotoxicidade das substâncias químicas

#### 3.3.1. Genotoxicidade

Em toxicologia, a genotoxicidade refere-se à capacidade de substâncias nocivas de danificar a informação genética nas células. Essas substâncias podem ser químicas, físicas e biológicas. Sendo exposto a estes agentes pode resultar em instabilidade genómica e/ou alterações epigenéticas, que se traduzem em uma variedade de doenças, incluindo o cancro<sup>62</sup>.

As substâncias genotóxicas podem induzir a ocorrência de erros durante a replicação, reparação e recombinação do DNA que pode resultar em danos no DNA ou nos cromossomas, ou mutações através de interações diretas ou indiretas com o material genético<sup>62</sup>. Tal dano numa célula germinativa tem o potencial de causar uma característica hereditária, numa célula somática pode levar a transformação maligna<sup>18</sup>.

Os testes desenvolvidos *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidade contém uma variedade de parâmetros que detetam danos no DNA ou as suas consequências biológicas em células procarióticas (por exemplo, bactérias) ou eucarióticas (por exemplo, de mamíferos, aves ou leveduras). Estes ensaios são usados para avaliar a segurança de produtos químicos ambientais e de produtos de consumo e para explorar o mecanismo de ação de agentes cancerígenos conhecidos ou suspeitos<sup>18</sup>. Atualmente, o ensaio do cometa é a técnica de eleição para detetar quebras na cadeia de DNA, tal como o teste dos micronúcleos para avaliação de substâncias químicas<sup>63,64</sup>. Estes dois ensaios têm sido amplamente utilizados em estudos de avaliação ambiental ou de riscos ocupacionais associados à exposição a potenciais genotóxicos<sup>65</sup>.

No presente estudo avaliamos a genotoxicidade através do ensaio dos micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN).

#### 3.3.1.1. Ensaio dos micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

O ensaio dos micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) é um teste *in vitro* regularmente utilizado para avaliação de genotoxicidade e é o método preferido em estudos de biomonitorização humana para detetar efeitos citogenéticos após exposição a agentes genotóxicos<sup>1,21</sup>. Este ensaio permite medir danos no DNA, através da deteção de micronúcleos (MN) no citoplasma das células em interfase<sup>21</sup>. Os MN são pequenos corpos extranucleares, que se podem originar a partir de fragmentos de cromossomas acêntricos (ou seja, sem centrômero), ou cromossomas inteiros que são incapazes de migrar para os polos durante a anáfase da divisão celular<sup>64,66</sup>. Eles refletem, portanto, a ocorrência de danos aneugénicos e clastogénicos<sup>64</sup>. O ensaio para além de detetar MN, também mede outras anomalias nucleares como pontes nucleoplasmáticas (NPBs) – biomarcador de rearranjos cromossómicos; e protusões nucleares (NBUDs) - biomarcador de eliminação de DNA amplificado<sup>4,21</sup>.

O CBMN é um método padronizado e validado que segue a *Guideline* 487 da OCDE para testes de produtos químicos<sup>67,68</sup>. Pode ser usado em células humanas ou de mamíferos, que são expostas ao agente químico em estudo e avaliadas quanto à presença de MN. Pode ser utilizado o protocolo com adição de citocalasina-B (cytoB) ou sem adição de cytoB<sup>4</sup>. A cytoB é um inibidor de citocinese, que caso adicionado, origina células binucleadas (BN), por isso, a avaliação dos MN deve ser feita nas células que completaram a mitose (figura 3.2)<sup>68</sup>. Na interpretação dos resultados por este método, deve-se ter em consideração que podem apresentar tanto intra quanto inter-variabilidade. Pode-se observar variações dentro do mesmo ensaio ou entre diferentes ensaios, isso pode afetar a frequência de MN e a aplicação dos critérios de avaliação, que podem depender da experiência de quem estiver a avaliar. As diretrizes internacionais para a realização de estudos de biomonitorização com CBMN recomendam que cada avaliador seja experiente para que os critérios de avaliação não sejam alterados durante a análise<sup>69,70</sup>.

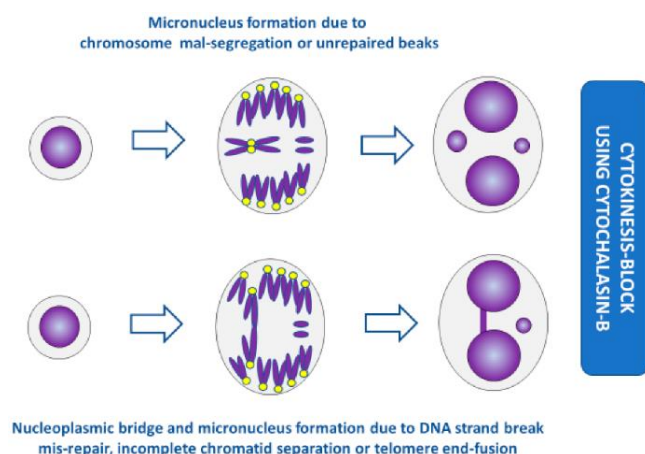


Figura 3.2 - Formação de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas no bloqueio da citocinese. Fonte: Fenech M., 2020.

O ensaio CBMN é um teste relativamente rápido comparativamente com outras técnicas citogenéticas, pode levar 5 dias a ser concluído, e é adequado para diferentes tipos de células<sup>67</sup>. O CBMN é um bom método para biomonitorização de grandes populações expostas a agentes genotóxicos em ambientes ocupacionais e ambientais<sup>1,71</sup>.

### 3.4. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR é um método utilizado na identificação de materiais e na quantificação de constituintes em uma amostra. Tradicionalmente, a espectroscopia de FTIR tem sido utilizada por químicos para a caracterização de moléculas e estruturas moleculares. No entanto, o potencial da técnica para analisar amostras biológicas como ferramenta de diagnóstico do cancro tem sido reconhecido há décadas<sup>72</sup>.

Em espectroscopia infravermelha, a radiação infravermelha (IV) usada, é uma radiação eletromagnética (EMR) com comprimentos de onda mais longos do que a radiação visível, sendo invisível ao olho humano. A região IV do espectro eletromagnético varia em comprimentos de onda de 0,8-100  $\mu\text{m}$ , ilustrados na tabela 3.1. Normalmente, o IV é dividido em três faixas: IR-próximo, IR-médio e IR-longínquo. A maior parte do espectro infravermelho utilizado em aplicações médicas está na faixa do IR-médio, considerando a radiação do espectro eletromagnético, no intervalo de número de onda de 400  $\text{cm}^{-1}$  a 4000  $\text{cm}^{-1}$ <sup>73</sup>.

Tabela 3.1 - Região do espectro infravermelho. Adaptado de Fadlelmoula et al., 2022.

<b>Região</b>	<b>Comprimento de onda (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Frequência (<math>\times 10^{14}</math> Hz)</b>
<i>IR-próximo</i>	0.8-2,5	12,500-4000	3.75-1.2
<i>IR-médio</i>	2.5-25	4000-400	1.2-0.12
<i>IR-longínquo</i>	25-100	400-100	0.12-0.03

Em espectroscopia de IV-médio, a radiação absorvida é convertida em energia vibracional pelas moléculas da amostra. O sinal que aparece no detetor apresenta-se como um espectro, que representa uma impressão digital molecular da amostra<sup>74</sup>. O espectro IV é assim característico de cada tipo de molécula, porque depende principalmente da massa dos átomos, do seu arranjo geométrico e das forças de ligação entre eles<sup>75</sup>. Como cada material diferente é uma combinação única de átomos e dado que como não há duas moléculas diferentes que possuam essas três mesmas características, cada molécula terá, em teoria, um espectro distinto<sup>73,75</sup>. Além disso, a amplitude das bandas no espectro pode ser proporcional à quantidade de material presente<sup>73</sup>.

Uma vez que a certas regiões do espectro são atribuídas a ligações moleculares específicas, sabendo a composição de todas as biomoléculas, pode-se extrapolar esses resultados e associar essas biomoléculas a certas regiões do espectro de absorção do IV<sup>75</sup>. É possível quantificar as diferentes biomoléculas como ácido nucleicos, proteínas, lípidos e carboidratos dentro da mesma amostra<sup>72</sup>.

Depois dos espectros serem obtidos são aplicadas técnicas de pré-processamento, pois permite a minimização de fenômenos físicos devido a variações indesejáveis, como ruído e diferenças ao longo da espessura do filme analisado<sup>75</sup>.

### 3.4.1. Vantagens

A espectroscopia de FTIR, em relação a um espectrômetro dispersivo, é uma técnica útil para vários tipos de análise. Pode fornecer informações sobre identificação de materiais, determinar a qualidade ou consistência de uma amostra, e determinar a quantidade de componentes em uma mistura<sup>73</sup>. É uma técnica relativamente simples e barata<sup>22</sup>, é mais rápida porque todas as frequências são medidas simultaneamente e feitas em questão de segundos. Os detetores usados são muito mais sensíveis, o que

permite a identificação de contaminantes em menores concentrações. Além disso, estes instrumentos são autocalibráveis<sup>24</sup>. Com estas características, esta técnica poderia ser facilmente implementada na análise de rotina de populações em risco, ou em estudos de monitoramento em larga escala para identificar populações em risco<sup>67</sup>.

### 3.4.2. Aplicações

Como a técnica permite adquirir o estado metabólico de um sistema biológico, diretamente das células ou do ambiente celular, é conseqüentemente aplicado em uma alta diversidade de aplicações biomédicas, como detecção de infecções, monitorização do impacto de biocompostos no consumo do perfil plasmático, identificação de mecanismos de morte celular, diagnóstico de cancro e classificação, e diagnóstico e prognóstico de outras doenças, permitindo a monitorização da eficiência dos tratamentos<sup>67</sup>. Também tem ganho popularidade recentemente na avaliação do impacto dos contaminantes para o ser humano<sup>76,77</sup>. Tem sido usado para pesquisa de MPs, na determinação da composição química de fragmentos de plástico desconhecidos comparando com espectros de polímeros conhecidos<sup>77</sup>.

A utilização da análise FTIR ainda abrange uma ampla gama de aplicações em vários setores, como por exemplo<sup>75,78</sup>:

- Nanotecnologia, nomeadamente nos nanomateriais e nanoestruturas;
- Indústria farmacêutica, no controlo de qualidade e verificação da composição dos medicamentos;
- Análise de alimentos, para avaliação do conteúdo nutricional e detecção de adulterantes;
- Detecção forense, para análise de vestígios de evidências;
- Conservação de arte, para auxiliar a análise de pigmentos e corantes ajudando nas restaurações e preservação.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Tipo de estudo**

O presente estudo é classificado como experimental visto que, segundo Fortin<sup>79</sup>, refere-se a uma relação de causalidade que pressupõe o estudo das relações entre as variáveis. É um estudo quantitativo porque a sua elaboração conduzirá à obtenção de dados estatísticos observáveis e quantificáveis.

### **4.2. Local do estudo**

O estudo foi desenvolvido na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) em parceria com o Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL). As exposições das culturas celulares e a realização e avaliação de viabilidade celular e de genotoxicidade por CBMN foi realizada nos laboratórios do Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC) da ESTeSL. As análises por espectroscopia FTIR foram realizadas no ISEL.

### **4.3. Variáveis**

#### **As variáveis independentes são:**

- As concentrações individuais de BPA de 1 ng/mL;
- As concentrações individuais de NPs de 200 µg/mL;
- As concentrações combinadas de BPA+NP de 1 ng/mL+ 200 µg/mL.

#### **As variáveis dependentes são:**

- Avaliação da viabilidade celular e de genotoxicidade por CBMN;
- Impacto no metabolismo celular por espectroscopia de FTIR.

### **4.4. Soluções de BPA e NP testadas**

Neste trabalho foram testadas exposições a soluções individuais de 1 ng/mL de BPA e 200 µg/mL de nanopartículas de Poliestireno (PS-NPs), e as soluções combinadas de

BPA com PS-NPs (1 ng/mL + 200 µg/mL). O BPA e PS-NPs foram adquiridos da Sigma-Merck®. A preparação das soluções químicas foi efetuada como descrito em Brito<sup>4</sup>.

#### 4.5. Cultura celular

Foram utilizadas células gástricas humanas GP202, pertencentes à linhagem celular de carcinoma gástrico estabelecido por Gartner et al<sup>80</sup>. Estas células são caracterizadas por terem junções intercelulares pouco abundantes a nível ultraestrutural e crescem em cultura em monocamada fina e compacta, com uma morfologia hexagonal ou em forma de sinete. São células epiteliais que apresentam semelhança na morfologia e no perfil antigénico do tumor primário.

De forma breve, as células GP202 foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich), e 1% de estreptomicina e penicilina (Merck), usando frascos T25 colocados na estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 2 dias foi realizada a troca do meio de cultura, quando atingida a confluência das células, estas foram tripsinizadas (Tripsina 0,05%, Sigma-Aldrich) e colocadas num frasco T75, numa passagem de 1:3. Posteriormente, foi feita a manutenção da cultura celular até à sua utilização para os ensaios.

Para o ensaio da obtenção das amostras para a espectroscopia FTIR, as células foram semeadas a uma densidade de 8x10<sup>4</sup> células/poço numa placa de 24 poços. Foram feitas as exposições durante 24h a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5% às seguintes condições:

- Controlo negativo
- BPA (1 ng/mL)
- PS-NPs (200 µg/mL)
- BPA + PS-NPs (1 ng/mL + 200 µg/mL)

Como controlo positivo, utilizou-se 5 µg/mL de colchicina, de acordo com a OECD *Guideline* 487, numa incubação de 3h, antes das 24h de exposição aos restantes compostos. Foram realizadas três replicas biológicas para cada condição.

Após as 24h de exposição, foi removido o meio com o tratamento de todos os poços e as células foram lavadas duas vezes com PBS, juntou-se meio novo com 6 µL de cytoB, incluindo controlos negativo e positivo, e manteve-se as placas na estufa por 44h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.6. Avaliação da viabilidade celular e genotoxicidade pelo método convencional

Os ensaios da citotoxicidade e da genotoxicidade foram descritos e realizados por Brito<sup>4</sup>. Para estes ensaios utilizaram-se células a uma densidade de  $4,0 \times 10^4$  células/poço, numa placa de 24 poços.

A viabilidade celular foi obtida através de Cell Titer- Blue® Cell Viability Assay (Promega) que tem como base avaliar a capacidade metabólica celular, ou seja, a capacidade das células viáveis de converterem um corante redox (resazurina) em um produto final com fluorescência (resorufina). Foram usados como controlos negativos células cultivadas em meio de cultura padrão e em meio de cultura suplementado com 50 ng/mL de etanol (veículo). Foram feitas três replicas biológicas para cada composto. Após as 24h de exposição individual e combinada de BPA e PS-NP nas concentrações já referidas, foi adicionado o reagente CellTiter-Blue de acordo com as instruções do fabricante, as células foram incubadas por 4h e a viabilidade foi determinada pela medição de fluorescência emitida a 590 nm.

Para o ensaio da genotoxicidade por CBMN as células obtidas após 24h da exposição, e já com meio novo, foi adicionado a cada poço 6 µg/mL de cytoB, incluindo controlos negativo e positivo, e foram incubadas na estufa a 37°C, CO<sub>2</sub> a 5% durante 44h. Após isso, foi removido o meio de cada poço, feita uma lavagem com PBS, adicionado 350 µL de Tripsina (0,05%) e as células foram incubadas na estufa durante 2 minutos. Após as células estarem soltas, foi adicionado meio com FBS, de forma a inativar a tripsina, e foram feitas as lâminas para observação ao microscópio, a partir da centrifugação da suspensão celular num citofunil. As lâminas foram coradas com solução Giemsa após secagem ao ar, e montadas com Entellan®. As células foram analisadas seguindo a *Guideline* 487 OCDE e identificadas de acordo com Fenech<sup>81</sup> na presença de MN, NPB e NBUD.

#### 4.7. Avaliação de espectroscopia FTIR

Foram considerados para análise por espectroscopia FTIR:

- Os meios de cultura obtidos após 24h de exposição aos compostos indicados (S1);
- Os meios de cultura após 44h finda a exposição anterior (S2);
- As células após as 44h finda a exposição anterior.

Os meios de cultura foram mantidos a -20°C até à análise.

Passadas as 44h, as células foram lavadas uma vez com PBS. De seguida, foi adicionado 500 µL de Tripsina (0,05%) a cada poço e as células foram incubadas na estufa durante cerca de 2 a 3 minutos, e verificadas ao microscópio invertido se estavam suspensas.

Após as células estarem soltas foram lavadas com PBS e a suspensão foi centrifugada num tubo falcon, de onde se obteve o pellet de cada amostra, que foi guardado a -20°C, até à análise por espectroscopia FTIR.

#### 4.7.1. Análise do meio de cultura e *pellet* celular

Os sobrenadantes S1 e S2 foram descongelados à temperatura ambiente e homogeneizados por vortex. Cada amostra foi analisada em triplicado por colocação de 25 µL numa placa de Si com 96 poços.

Os *pellets* foram descongelados à temperatura ambiente e foram homogeneizados com a ajuda de uma micropipeta. Cada *pellet* celular foi analisado sem diluição e após diluição em água a 1/6, por mistura de 4 µL do *pellet* com 20 µL de água. Cada amostra foi analisada em triplicado, e foi pipetado 5 µL da amostra para uma placa de Si com 384 poços.

As amostras de sobrenadante e de *pellet* nas placas de Si, foram subsequentemente desidratadas num dissecador com sílica, e sob vácuo durante 2.5 horas, antes da aquisição dos espectros de FTIR.

Os espectros foram obtidos usando um espectrómetro FTIR (Vertex 70, Bruker, Alemanha), equipado com um módulo HTS-XT (Bucker, Alemanha). Cada espectro foi obtido de 32 scans, com 2 cm<sup>-1</sup> de resolução e foram obtidos em modo de transmissão entre o número de onda de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>. O primeiro poço da placa ficou sem amostra, e os espectros correspondentes foram adquiridos após correção ao 1º poço, de acordo com o fabricante do HTS-XT.

Os espectros foram pré-processados por correção atmosférica (ATM) com o software OPUS 6.5 (Bruker). Os espectros com ATM foram subsequentemente pré-processados por correção à linha de base (BC), normalização de vetores unitários (UVN), correção à linha de base e normalização (BC + UVN), segunda derivada (2D) e segunda derivada com normalização (2D+UVN). A segunda derivada foi calculada a partir de espectros brutos usando o algoritmo Savitzky-Golay, considerando um polinómio de 2ª ordem em uma janela de 15 pontos. Estes pré-processamentos foram efetuados através do software Unscrambler® X (versão 10.5, CAMO software AS, Noruega).

#### 4.7.2. Análise univariada dos espectros FTIR

Foram identificadas as bandas principais dos espectros com correção à linha de base e normalizados, e a segunda derivada normalizada. Após a identificação, foram determinadas as absorvâncias dessas bandas para as cinco condições estudadas: controlo negativo, BPA, PS-NP, BPA + PS-NP e colchicina.

Efetuaram-se comparações múltiplas para avaliar a existência de alterações estatisticamente significativas, através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni, e por comparações entre pares pelo teste U Mann-Whitney, com recurso ao software IBM SPSS Statistics 29.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Impacto na viabilidade celular e genotoxicidade baseado no ensaio CBMN

Os resultados da viabilidade celular na exposição individual e combinada nas concentrações mais elevadas de BPA (1 ng/mL) e PS-NP (200 µg/mL) estão apresentados na tabela 5.1. Não foram observadas diferenças estatísticas a 10% de significância entre os pares dos diversos ensaios, através do teste não paramétrico U Mann-Whitney.

Tabela 5.1 - Avaliação da viabilidade celular após 24h de exposição individual de PS-NP (200µg/mL) e de BPA (1 ng/mL) e combinada de 1 ng/mL de BPA com 200 µg/mL PS-NP. Os resultados foram obtidos de Brito<sup>4</sup>.

	<b>Controlo negativo</b>	<b>Veículo</b>	<b>BPA</b>	<b>PS-NP</b>	<b>BPA + PS-NP</b>
<b>Réplica 1</b>	0,385	0,468	0,460	0,442	0,360
<b>Réplica 2</b>	0,429	0,369	0,260	0,421	0,394
<b>Réplica 3</b>	0,326	0,364	0,344	0,395	0,374
<b>Média</b>	0,380	0,400	0,355	0,419	0,376
<b>Desvio Padrão</b>	0,042	0,048	0,082	0,019	0,014

Os dados obtidos da avaliação dos biomarcadores de danos de DNA (MN, NPBs e NBUDs) na exposição combinada de 200 µg/mL de PS-NPs e 1 ng/mL de BPA estão apresentados na tabela 5.2 e na figura 5.1. Não foram observadas diferenças estatísticas a 10% de significância entre os pares dos diversos ensaios, através do teste não paramétrico U Mann-Whitney. No entanto observa-se uma tendência de aumento dos parâmetros avaliados mesmo não sendo estatisticamente diferentes.

Tabela 5.2 - Avaliação dos biomarcadores genotóxicos MN, NPB e NBUD, em 500 células binucleadas observadas. Os valores médios e respetivos desvios padrões dos parâmetros avaliados foram obtidos de Brito<sup>4</sup>.

	Controlo negativo		Controlo positivo		PS-NP + BPA		p-value		
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Controlo positivo vs controlo negativo	Controlo negativo vs PS-NP+BPA	Controlo positivo vs PS-NP+BPA
<b>MN</b>	13,33	14,64	20,00	21,66	22,67	18,56	1	0,7	1
<b>NPB</b>	3,67	3,51	12,33	6,11	9,00	8,19	0,12	0,51	0,824
<b>NBUD</b>	1,33	1,15	5,00	5,57	12,67	10,97	0,5	0,49	0,5

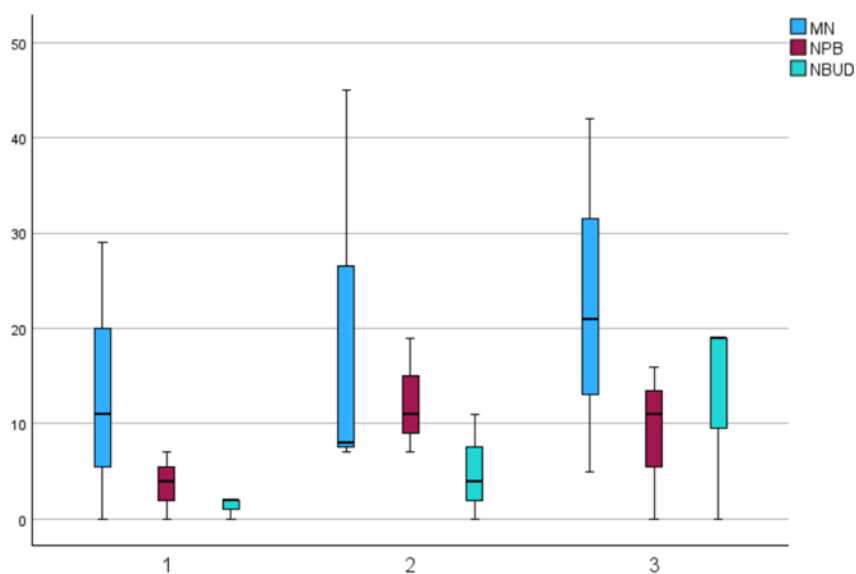


Figura 5.1- Representação dos biomarcadores genotóxicos dos controlos negativo (1), positivo (2) e da exposição combinada de BPA+PS-NP (3).

A partir da figura 5.1 é possível observar, no controlo negativo, uma baixa frequência de MN, NPB e NBUD, como esperado em células sem exposição. No controlo positivo, os níveis dos biomarcadores aumentaram, refletindo a eficácia do ensaio em detetar genotoxicidade. No grupo de exposição ao BPA com PS-NPs, verifica-se o aumento dos parâmetros em comparação com o controlo negativo, indicando que a exposição combinada pode induzir danos genéticos.

Existe uma grande variabilidade biológica das células e provavelmente devido à reduzida dimensão da amostra estudada, não foi possível detetar diferenças estatísticas.

## 5.2. Análise das bandas de espectros do meio de cultura

Obtiveram-se os espectros FTIR dos meios de cultura dos ensaios, das células submetidas a cinco condições diferentes: 1 - controlo negativo; 2 - BPA; 3 – PS-NP; 4 - BPA+PS-NP e 5 – colchicina, e obtidos em dois tempos diferentes:

- Após exposição destas condições durante 24h, designado por 0h após exposição;
- Após 44h do fim da exposição a estas condições, designado por 24h após finda a exposição.

Os espectros foram obtidos em análises efetuadas em triplicado de cada uma das amostras. A Fig. 5.2, representa os espectros obtidos das 0h e 24h sem pré-processamento (Fig. 5.2A), e as médias dos espectros das 5 condições com correção à linha de base (Fig. 5.2B), correção à linha de base com normalização (Fig. 5.2C), com a 2ª derivada (Fig. 5.2D) e da 2ª derivada com normalização (Fig. 5.2E a 5.2H). Os espectros apresentam uma forma muito semelhante para as várias condições, dado refletirem a composição química dos principais constituintes do meio de cultura. A normalização minimiza o efeito da quantidade de amostra analisada, pelo que os espectros normalizados são mais parecidos ainda. A 2ª derivada dos espectros ao resolver algumas bandas sobrepostas, aumenta a informação disponível. Muito interessante, algumas das bandas no espectro da 2ª derivada aparentam depender da condição do ensaio. Para melhor avaliar isto, identificaram-se as bandas principais dos espectros normalizados com ou sem derivada. Uma desvantagem da segunda derivada, é poder aumentar o ruído em algumas zonas do espectro, pelo que se analisou o espectro com ou sem derivadas.

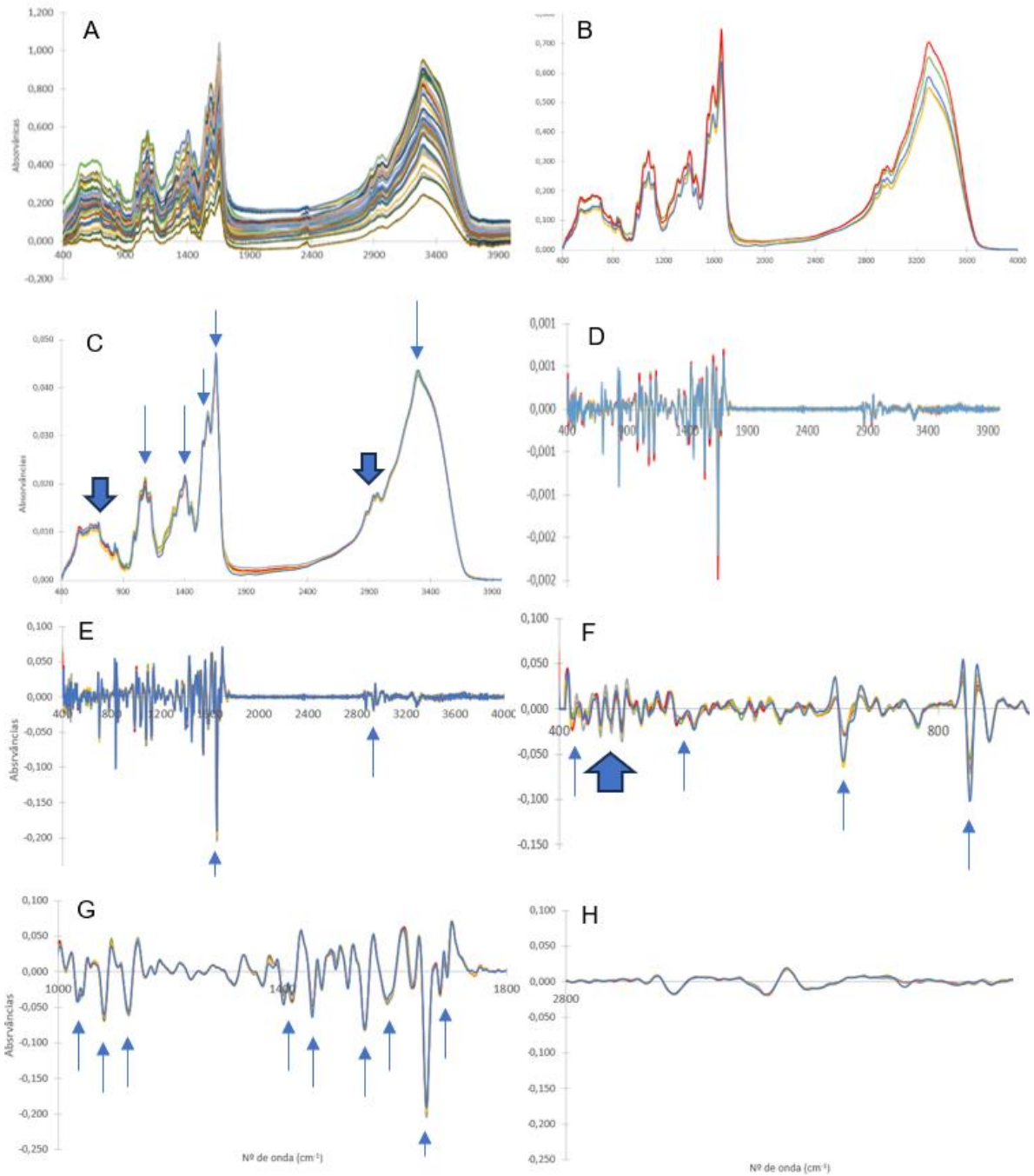


Figura 5.2 - Espectros de FTIR do meio de cultura sem pré-processamento (A); média dos espectros com correção à linha de base (B), correção à linha de base com normalização (C), 2<sup>a</sup> derivada (D) e 2<sup>a</sup> derivada com normalização (E- H). Vermelho – controlo, cinzento – BPA, amarelo – PS-NP, azul – BPA+NP, verde – colchicina. As setas indicam as bandas seleccionadas para a análise estatística.

Identificaram-se as seguintes bandas espectrais principais:

- Para o espectro com correção à linha de base com normalização identificaram-se as seguintes 21 bandas: 543, 700, 780, 835, 854, 927, 994, 1048, 1081, 1120, 1315, 1369, 1405, 1455, 1553, 1594, 1656, 2885, 2942, 2972 e 3300  $\text{cm}^{-1}$ .

- Para a 2ª derivada do espectro normalizada identificaram-se as seguintes 42 bandas: 413, 443, 455, 466, 486, 524, 543, 634, 657, 673, 700, 834, 854, 895, 924, 989, 1034, 1044, 1081, 1126, 1154, 1202, 1237, 1314, 1366, 1403, 1417, 1452, 1469, 1517, 1546, 1587, 1633, 1656, 1681, 1695, 1743, 2872, 2934, 2963, 2853 e 3283  $\text{cm}^{-1}$ .

De forma a avaliar se havia bandas estatisticamente diferentes efetuaram-se:

- Comparações múltiplas entre as 5 condições estudadas, baseadas no teste de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni a 5% e a 10%;
- Comparações por pares de condições, baseadas no teste U Mann-Whitney.

#### 5.2.1. Comparações múltiplas de bandas espectrais entre as 5 condições

Foram observadas várias bandas estatisticamente diferentes quer a 5% quer a 10%, nos meios de cultura às 0h e 24h (Tabelas 5.3 e 5.4). De uma forma geral, a normalização dos espectros implicou sempre um aumento do número de bandas estatisticamente diferentes, quer quando aplicada à correção de linha de base quer quando aplicada à 2ª derivada. A única exceção a esta observação foi no meio de cultura com 24h após finda a exposição, e a 10% de significância. Isto realça a importância da normalização para minimizar efeitos de quantidades de células no ensaio. A normalização, ao minimizar estes efeitos, vai realçar as diferenças bioquímicas existentes no sistema. Foi observado também que a segunda derivada aumenta o número de bandas estatisticamente diferentes, realçando a relevância deste pré-processamento na resolução de bandas sobrepostas, e por consequência no aumento da informação espectral.

Foi também observado, que, de uma forma geral, o número de bandas afetadas foi maior às 0h após exposição em relação às 24h, com exceção para os espectros sem normalização a 10% de significância. Isto é expectável, uma vez que às 0h, obtemos a amostragem imediatamente após o fim da exposição às condições de stresse, enquanto o período das 24h após finda a exposição já reflete a recuperação das células às condições de stresse.

Tabela 5.3 - Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni a 5% e a 10% dos espectros das 0h após exposição, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes.

<b>Pré-processamento</b>	<b>Bandas estatisticamente diferentes a 10% (<math>p &lt; 0.1</math>)</b>	<b>Bandas estatisticamente diferentes a 5% (<math>p &lt; 0.05</math>)</b>
<b>Correção à linha de base</b>	547; 631; 779; 854; 990; 1044; 1058; 1081; 1120	990; 1081; 1058
<b>Correção à linha base e normalização</b>	543(4-5/4-1); 994(2-5); 1048(2-5); 1081(2-5); 1120; 1369; 1656; 2942(5-4/2-4); 2972(5-4)	543; 1048(2-5); 1081; 2942(5-4); 2972(5-4)
<b>2ª derivada</b>	466(2-5); 525(1-2); 542; 593(5-4/5-3/5-2); 607; 659(4-1/4-5/3-5); 700(4-1/4-5/4-2/3-5/3-2); 779; 833(4-2/4-5); 988(1-2); 1351(1-4); 1402(4-5/4-2); 1417; 1453(4-2); 1631(4-2); 1681(5-2); 1695(4-2/4-5/4-1/3-1); 1747(1-4/5-4/2-4)	466(2-5); 593(5-4/5-3/5-2); 659(4-1/4-5); 700(4-5/4-2/3-5/3-2); 833(4-5); 988; 1351(1-4); 1402(4-2); 1417; 1453(4-2); 1631(4-2); 1681; 1695(4-2/4-5/4-1/3-1); 1747(1-4/5-4)
<b>2ª derivada com normalização</b>	466(2-5); 524(1-2); 657(4-2/4-1/4-5/3-5); 700(3-5/3-1/3-2/4-5/4-1/4-2); 834(4-2/4-1/4-5/3-5); 924(2-3); 1044(4-5); 1081(5-3/5-4); 1154(3-2); 1314(5-2/5-1/5-3); 1201; 1366(4-5); 1403(4-1/4-2/4-5/3-5); 1417(5-3/5-4/1-4); 1452(4-1/4-5/4-2/3-1/3-5/3-2); 1469(4-2/4-5/4-1/3-5/3-1); 1587(3-5/5-4); 1681; 1695(4-2/4-5/4-1/3-5/3-1); 1743(1-4/5-4/3-4/2-4); 2872(5-3)	466(2-5); 657(4-2/4-1/4-5); 700(3-5/3-1/3-2/4-5/4-1/4-2); 834(4-1/4-5/3-5); 924(2-3); 1081(5-4); 1154(3-2); 1314(5-3); 1403(4-1/4-2/4-5/3-5); 1417(5-3/5-4); 1452(4-1/4-5/4-2/3-1/3-5/3-2); 1469(4-2/4-5/4-1/3-1); 1587(3-5/5-4); 1695(4-2/4-5/4-1/3-1); 1743(1-4/5-4/3-4/2-4); 2872(5-3)

Nas 0h após exposição, os seguintes pares de condições foram estatisticamente diferentes a 5%, do espectro da 2ª derivada com normalização:

- Entre a condição 1 e 3, i.e., PS-NP versus o controlo negativo: 700, 1452, 1469, 1695  $\text{cm}^{-1}$ .
- Entre a condição 1 e 4, i.e., controlo negativo versus BPA+PS-NP: 657, 834, 1403, 1452, 1469, 1695, 1743  $\text{cm}^{-1}$ .
- Entre a condição 2 e 3, i.e., BPA versus PS-NP: 924, 1154, 1452  $\text{cm}^{-1}$ .
- Entre a condição 2 e 4, i.e., BPA versus BPA+PS-NP: 657, 700, 1403, 1452, 1469, 1695, 1743  $\text{cm}^{-1}$ .
- Entre a condição 2 e 5, i.e., BPA versus colchicina: 466, 657, 700, 834, 1081, 1403, 1417, 1452, 1469, 1587, 1695, 1743  $\text{cm}^{-1}$ .
- Entre a condição 3 e 4, i.e., PS-NP versus BPA+NP: 1743  $\text{cm}^{-1}$ .
- Entre a condição 3 e 5, i.e., PS-NP versus colchicina: 700, 834, 1314, 1403, 1417, 1452, 1587, 2872  $\text{cm}^{-1}$ .

Observou-se, às 0h após exposição, várias bandas espectrais estatisticamente diferentes, que mostram:

- O impacto do PS-NP ou do PS-NP com BPA em relação ao controlo negativo;
- O impacto do BPA é diferente do PS-NP;
- O impacto do BPA junto com PS-NP é diferente do impacto do BPA ou PS-NP isolados;
- O impacto do BPA ou do PS-NP isolados é diferente do impacto do controlo positivo (i.e., da colchicina).

Observou-se também que as condições do BPA isolado e do PS-NP isolado em relação ao controlo positivo (i.e., da colchicina) e a mistura do BPA com PS-NP em relação ao controlo negativo e ao BPA isolado, têm um maior impacto no metabolismo celular uma vez que o número de bandas afetadas é muito superior em relação às restantes condições.

Tabela 5.4 - Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni a 5% e a 10% dos espectros das 24h após finda a exposição, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes.

<b>Pré-processamento</b>	<b>Bandas estatisticamente diferentes a 10% (p&lt;0.1)</b>	<b>Bandas estatisticamente diferentes a 5% (p&lt;0.05)</b>
<b>Correção à linha de base</b>	547(2-4); 631(2-4); 678 (2-4); 700(2-4); 1044(2-4); 1058(2-4); 1081(2-4); 1365(2-4); 1402(2-4); 1551(2-4); 1656(2-4); 2872(2-4); 2933(2-4); 2961(2-4); 3300(2-4)	547(2-4)
<b>Correção à linha base e normalização</b>	780; 854; 927	854
<b>2ª derivada</b>	525; 700(2-4); 833(1-2); 924; 988(2-4); 1033(2-4); 1044(5-2/2-4); 1081(2-4); 1157(2-4); 1204; 1237(2-4); 1417(4-3/2-4); 1453(1-2); 1470(2-4); 1516(2-4/1-2); 1546(2-4); 1631(5-2/1-2/3-2); 1681(2-4); 1695; 2935	833(1-2); 1044(5-2); 1157(2-4); 1237(2-4); 1417(2-4); 1453(1-2); 1470(2-4); 1516(2-4); 1546(2-4); 1631
<b>2ª derivada com normalização</b>	413(2-1); 524(1-5); 543(2-5); 673(4-1); 834(3-4); 1081(2-4); 1417(4-3/2-4); 1154(2-4/3-4/5-2/5-3); 1402(3-4); 1452(2-3); 1469(2-4); 1517(2-4/1-2/2-5); 2853(4-5)	413(2-1); 673(4-1); 834(3-4); 1417(2-4); 1154(2-4/3-4/5-3); 1402(3-4); 1452(2-3); 1469(2-4); 1517(2-4); 2853(4-5)

Nas 24h após finda a exposição, os seguintes pares foram também estatisticamente diferentes a 5% com base no espectro de 2ª derivada com normalização:

- Entre a condição 1 e 2, i.e., controlo negativo *versus* BPA: 413 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 1 e 4, i.e., controlo negativo *versus* BPA+PS-NP: 673 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 2 e 3, i.e., BPA *versus* PS-NP: 1452 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 2 e 4, i.e., BPA *versus* BPA+PS-NP: 1154, 1417, 1469 e 1517 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 3 e 4, i.e., PS-NP *versus* BPA+PS-NP: 834, 1154 e 1402 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 3 e 5, i.e., PS-NP *versus* colchicina: 1154 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 4 e 5, i.e., BPA+PS-NP *versus* colchicina: 2853 cm<sup>-1</sup>;

Às 24h após finda a exposição, observou-se um número mais reduzido de bandas estatisticamente diferentes entre os pares de condições, em comparação com as observações feitas 0h após exposição. Curiosamente, o par BPA em relação ao controlo negativo, apresentou bandas diferentes apenas 24h após finda a exposição, enquanto que, às 0h após a exposição, não tinha mostrado bandas estatisticamente diferentes. O mesmo foi observado para o par BPA com PS-NP em relação à colchicina. Os resultados indicam que os efeitos induzidos pelo BPA e pela combinação do BPA com PS-NPs podem não ser imediatamente detetáveis, o que sugere que os mecanismos de toxicidade associados ao BPA e à interação do BPA com PS-NPs podem envolver processos metabólicos retardados, que levam tempo para manifestar-se em diferenças significativas nas bandas espectrais. Isto sugere que às 24h após finda a exposição houve alteração no metabolismo celular.

Observou-se também que o impacto da mistura de BPA com PS-NP é diferente em relação ao controlo e ao BPA ou PS-NP isolados. O par que compara o BPA isolado com a mistura de BPA com PS-NP, apresentou bandas distintas das observadas às 0h, exceto por uma banda comum (1469 cm<sup>-1</sup>). Isto indica uma mudança no metabolismo celular.

A condição do PS-NP em relação à colchicina apresentou apenas uma banda estatisticamente diferente e distinta das observadas às 0h, sendo que esta condição foi uma das que apresentou um maior número de bandas afetadas às 0h após a exposição. Às 24h após finda a exposição apresentou uma composição química diferente logo o metabolismo celular foi diferente.

Foram representados gráficos de bigodes para as bandas que apresentaram o maior número de pares estatisticamente diferentes às 0h após exposição (Fig. 5.4) e 24h após finda a exposição (Fig. 5.5).

Para as 0h após exposição, as bandas representadas foram:

- 700  $\text{cm}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), que implicou os seguintes pares estatisticamente diferentes: 3 vs 1 ( $p < 0.001$ ), 4 vs 1 ( $p = 0.011$ ), 3 vs 2 ( $p < 0.001$ ), 2 vs 4 ( $p = 0.005$ ), 3 vs 5 ( $p = 0.002$ ), 4 vs 5 ( $p = 0.031$ );
- 1452  $\text{cm}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), que implicou os seguintes pares estatisticamente diferentes: 3 vs 1 ( $p = 0.048$ ), 3 vs 2 ( $p = 0.016$ ), 3 vs 5 ( $p = 0.025$ ), 4 vs 1 ( $p < 0.001$ ), 4 vs 5 ( $p < 0.001$ );
- 1695  $\text{cm}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), que implicou os seguintes pares estatisticamente diferentes: 3 vs 1 ( $p = 0.048$ ), 3 vs 5 ( $p = 0.098$ ), 4 vs 1 ( $p = 0.003$ ), 4 vs 2 ( $p = 0.007$ ), 4 vs 5 ( $p = 0.006$ );
- 1743  $\text{cm}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), que implicou os seguintes pares estatisticamente diferentes: 1 vs 4 ( $p = 0.001$ ), 2 vs 4 ( $p = 0.027$ ), 3 vs 4 ( $p = 0.016$ ), 4 vs 5 ( $p = 0.005$ ).

Para as 24h após finda a exposição, a banda representada foi:

- 1154  $\text{cm}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), que implicou os seguintes pares estatisticamente diferentes: 4 vs 2 ( $p = 0.007$ ), 4 vs 3 ( $p = 0.003$ ), 5 vs 2 ( $p = 0.088$ ), 5 vs 3 ( $p = 0.046$ ).

A banda a 700  $\text{cm}^{-1}$  pertence à região *fingerprint*, e representa combinações complexas de vibrações de vários grupos funcionais. A banda a 1154  $\text{cm}^{-1}$ , é referente a grupos de carboidratos (C-O/C-O-H), isto é, espelha a reserva energética das células. As bandas a 1452  $\text{cm}^{-1}$  e a 1695  $\text{cm}^{-1}$  são referentes a proteínas, sendo esta última pertencente à amida I, e estão associadas a vibrações de deformação de grupos metil e metileno, e de grupos carbonilo (C=O), respetivamente. Isto indica que estas condições tiveram um impacto na síntese de proteínas. A banda a 1743  $\text{cm}^{-1}$ , é referente a vibrações de CH<sub>2</sub>-COOR, associados a ésteres de fosfolípidos indicando uma alteração provável da membrana citoplasmática<sup>22,67,82,83</sup>.

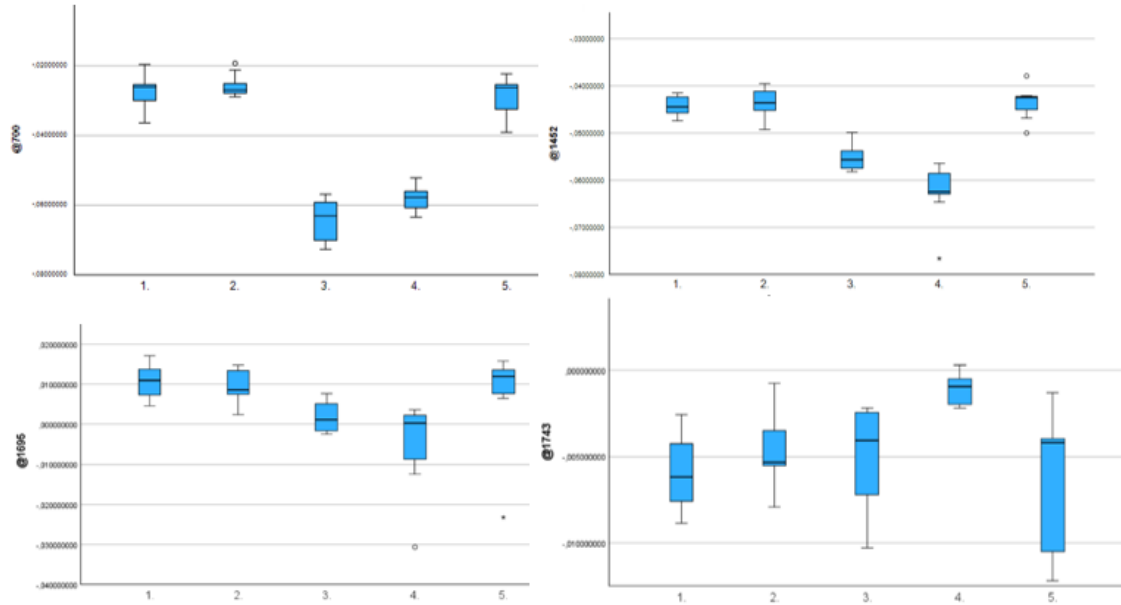


Figura 5.3- Representação do gráfico de bigodes das bandas com maior número de pares estatisticamente diferentes observadas nas comparações múltiplas das 5 condições, baseadas no espectro de meio de cultura às 24h, com segunda derivada e normalização.

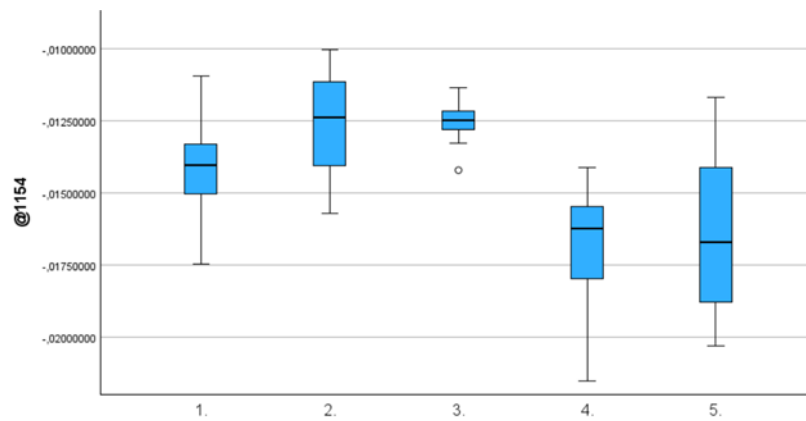


Figura 5.4 - Representação do gráfico de bigodes das bandas com maior número de pares estatisticamente diferentes observadas nas comparações múltiplas das 5 condições, baseadas no espectro de meio de cultura às 44h, com segunda derivada e normalização.

### 5.2.2. Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney

Observaram-se várias bandas estatisticamente diferentes a 1% no meio de cultura às 0h após a exposição e às 24h após finda a exposição (tabela 5.5 e 5.6).

A normalização levou a um aumento no número de bandas estatisticamente diferentes, tanto quando foi aplicado à correção de linha de base quanto à segunda derivada. Exceto às 24h após finda a exposição, onde a correção de linha de base não mostrou bandas estatisticamente diferentes. No entanto, a segunda derivada aumentou o número de bandas estatisticamente diferentes.

Observou-se que, às 0h após a exposição, o número de bandas estatisticamente diferentes é maior do que às 24h após finda a exposição.

Tabela 5.5 - Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney a 1% dos espectros das 0h após exposição, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes.

<b>Pré-processamento</b>	<b>Bandas estatisticamente diferentes a 1% (p&lt;0.001)</b>
<b>Correção à linha de base</b>	-
<b>Correção à linha base e normalização</b>	2942 (4-5)
<b>2ª derivada</b>	659 (4-5), 700 (2-3/2-4), 1695 (4-1/4-5), 1747 (4-1/4-5)
<b>2ª derivada com normalização</b>	466 (2-5), 657 (4-1/4-5), 700 (1-3/3-5/2-3/2-4), 834 (4-5), 1081 (4-5), 1154 (2-3), 1403 (4-5), 1417 (3-5/4-5), 1452 (2-4/4-5/4-1), 1469 (2-4/4-5/4-1), 1695 (2-4/4-5/4-1), 1743 (4-5/4-1)

Para as 0h após exposição, os seguintes pares foram estatisticamente diferentes a 1% com base no espectro da segunda derivada com normalização:

- Entre a condição 1 e 3, i.e., controlo negativo versus PS-NP: 700 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 1 e 4, i.e., controlo negativo vs BPA+PS-NP: 657, 1452, 1469, 1965 e 1743 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 2 e 3, i.e., BPA versus PS-NP: 700 e 1154 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 2 e 4, i.e., BPA versus BPA+PS-NP: 700, 1452, 1469 e 1695 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 2 e 5, i.e., BPA versus colchicina: 466 cm<sup>-1</sup>;

- Entre a condição 3 e 5, i.e., PS-NP versus colchicina: 700 e 1417  $\text{cm}^{-1}$ ;
- Entre a condição 4 e 5, i.e., BPA+PS-NP versus colchicina: 657, 834, 1081, 1403, 1417, 1452, 1469, 1695 e 1743  $\text{cm}^{-1}$ .

Às 0h após a exposição, várias bandas espectrais estatisticamente diferentes mostraram que:

- O impacto do PS-NP isolado ou do PS-NP com BPA é diferente do controlo negativo;
- O impacto do BPA é diferente do PS-NP;
- O impacto da colchicina ou do BPA é diferente do impacto do BPA junto com PS-NP;
- O impacto do BPA ou PS-NP isolados é diferente do impacto da colchicina.

Observou-se que a condição da mistura de BPA com PS-NP em relação ao controlo positivo (i.e., colchicina) teve um maior impacto no metabolismo celular, pois apresentou um número maior de bandas afetadas em relação às restantes condições.

Tabela 5.6 - Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney a 1% dos espectros das 24h após finda exposição, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes.

<b>Pré-processamento</b>	<b>Bandas estatisticamente diferentes a 1% (<math>p &lt; 0.001</math>)</b>
<b>Correção à linha de base</b>	-
<b>Correção à linha base e normalização</b>	-
<b>2ª derivada</b>	1516 (4-2)
<b>2ª derivada com normalização</b>	1154 (2-4/3-4), 1469 (2-4), 1517 (2-4)

Para as 24h após finda a exposição, os seguintes pares foram estatisticamente diferentes a 1% com base no espectro da segunda derivada com normalização:

- Entre a condição 2 e 4, i.e., BPA versus BPA+PS-NP: 1154, 1469 e 1517  $\text{cm}^{-1}$ ;
- Entre a condição 3 e 4, i.e., PS-NP versus BPA+PS-NP: 1154  $\text{cm}^{-1}$ .

Verificou-se uma diminuição nos pares de condições estatisticamente diferentes às 24h em relação às 0h após exposição. Observou-se que o impacto da mistura do BPA com PS-NP é diferente do impacto do BPA ou PS-NP isoladamente.

O par PS-NP em relação à mistura de BPA com PS-NP apresentou bandas diferentes apenas às 24h após finda exposição, pois às 0h este par não tinha mostrado bandas estatisticamente diferentes.

Também se observou que a combinação de BPA com PS-NP afeta um maior número de bandas em comparação ao BPA isolado, apresentando apenas uma banda comum com as 0h após a exposição ( $1469\text{ cm}^{-1}$ ), sendo as restantes bandas diferentes.

### 5.3. Análise das bandas de espectros das células

Obteve-se o espectro FTIR das células sem diluição, submetidas às 5 condições estudadas. Os espectros foram obtidos em análises efetuadas em triplicado de cada uma das amostras. A Fig. 5.6, representa os espectros obtidos das células sem pré-processamento (Fig. 5.6A), e as médias dos espectros das 5 condições com correção à linha de base (Fig. 5.6B), correção à linha de base com normalização (Fig. 5.6C), com a 2ª derivada (Fig. 5.6D) e da 2ª derivada com normalização (Fig. 5.6E a 5.6H).

Os espectros normais parecem sobrepor-se entre as várias condições. Pode-se observar diferenças ténues nas intensidades dos picos que pode indicar variações na concentração dos componentes ou mudanças estruturais induzidas pelos compostos químicos. Com a normalização, os espectros normalizados tornam-se mais parecidos. A 2ª derivada realça os picos sobrepostos, proporcionando uma melhor resolução das bandas, permitindo aumentar a informação disponível. É possível identificar que há regiões em que as bandas das várias condições são diferentes. Para além disso, a segunda derivada aumenta o ruído em algumas zonas do espectro. Identificaram-se as bandas principais dos espectros normalizados com ou sem derivada.

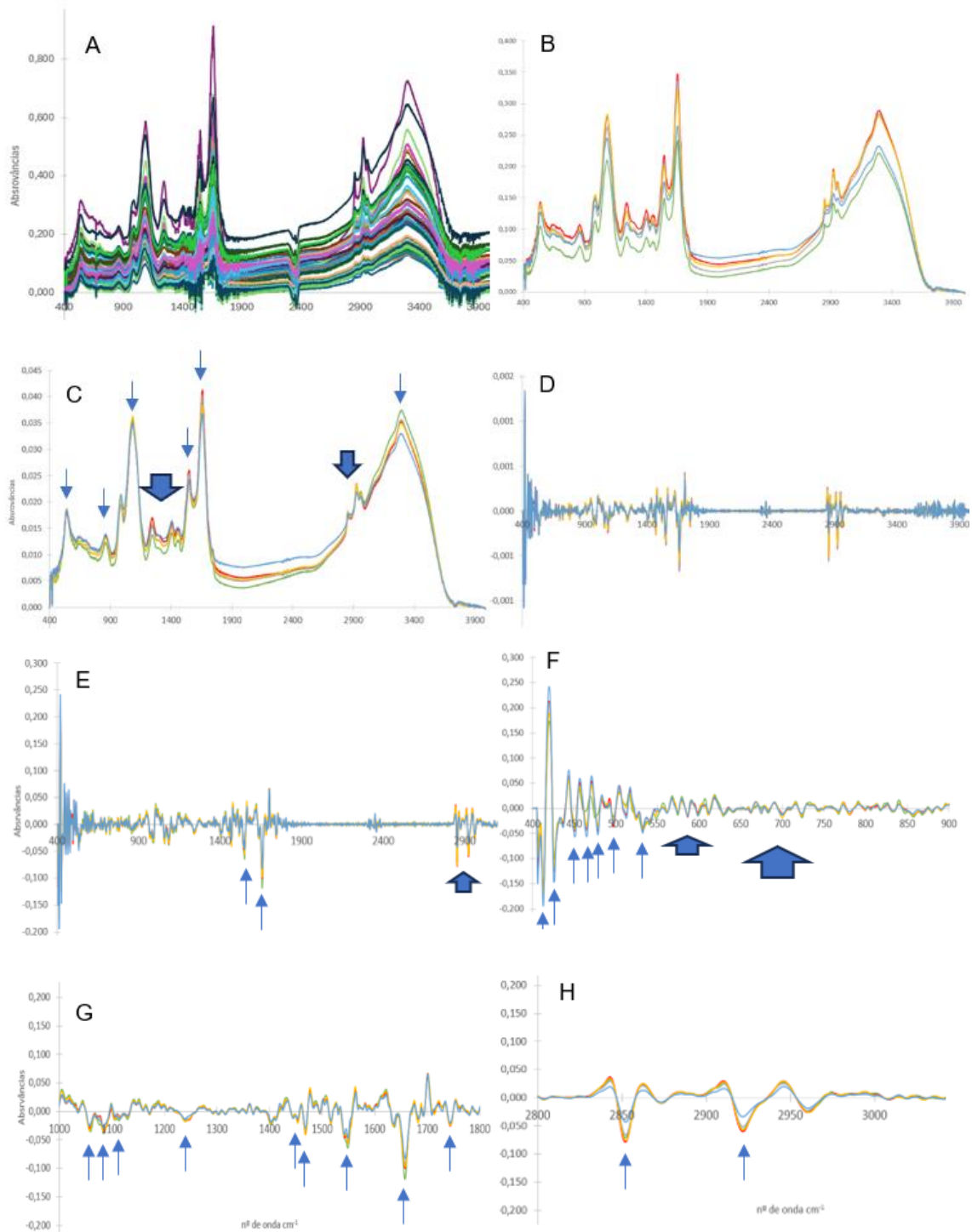


Figura 5.5 - Representação dos espectros de FTIR das células sem pré-processamento (A); média dos espectros com correção à linha de base (B), correção à linha de base com normalização (C), 2<sup>a</sup> derivada (D) e 2<sup>a</sup> derivada com normalização (E- H). Vermelho – controlo, cinzento – BPA, amarelo – NP, azul – BPA+NP, verde – colchicina. As setas indicam as bandas selecionadas para análise estatística.

Identificaram-se as seguintes bandas espectrais principais:

- Para o espectro com correção à linha de base com normalização identificaram-se 14 bandas: 540, 864, 992, 1084, 1246, 1406, 1458, 1468, 1547, 1656, 2854, 2926, 2961 e 3300  $\text{cm}^{-1}$ .

- Para a 2ª derivada do espectro normalizada identificaram-se 45 bandas: 412, 425, 436, 451, 464, 478, 496, 512, 524, 532, 540, 586, 573, 599, 611, 629, 675, 700, 723, 767, 781, 857, 969, 992, 1056, 1081, 1103, 1114, 1130, 1239, 1403, 1453, 1468, 1516, 1548, 1635, 1656, 1682, 1693, 1744, 1810, 2852, 2873, 2921 e 2961  $\text{cm}^{-1}$ .

Para avaliar se as bandas são estatisticamente diferentes efetuou-se:

- Comparações múltiplas entre as 5 condições estudadas, baseadas no teste de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni a 5% e a 10%;
- Comparações por pares de condições, baseadas no teste U Mann-Whitney.

#### 5.3.1. Comparações múltiplas de bandas espectrais entre as 5 condições

Foram observadas várias bandas estatisticamente diferentes a 5% como a 10% (tabela 5.7). A normalização dos espectros implicou um aumento do número de bandas estatisticamente diferentes, quando aplicada à correção de linha de base e à 2ª derivada. Foi observado também que a segunda derivada aumenta o número de bandas estatisticamente diferentes.

Tabela 5.7 - Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni a 5% e a 10% dos espectros das células, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes.

<b>Pré-processamento</b>	<b>Bandas estatisticamente diferentes a 10% (p&lt;0.1)</b>	<b>Bandas estatisticamente diferentes a 5% (p&lt;0.05)</b>
<b>Correção à linha de base</b>	-	-
<b>Correção à linha base e normalização</b>	1406(5-4); 1458(5-4); 1468(5-4); 3300(5-4)	1406(5-4); 1458(5-4); 1468(5-4); 3300(5-4)
<b>2ª derivada</b>	412(4-5/1-5/2-5); 425(4-5/1-5/2-5); 451(4-5/2-5/1-5); 496(1-3/1-5/2-5/4-5); 513(4-3/4-5/2-5/1-5); 524(2-5); 532(4-3); 586(1-5); 675(1-5/4-5/3-5); 1103; 1444(4-5); 1530(4-5/1-5/2-5); 1693; 1709(1-5/1-3/2-3)	412(4-5/1-5/2-5); 425(4-5/1-5/2-5); 451(4-5); 496(1-5/2-5); 513(4-5); 532; 586(1-5); 675(1-5/4-5); 1530(4-5/1-5/2-5); 1709(1-3);
<b>2ª derivada com normalização</b>	425(4-5); 451(4-5); 464(4-5/2-5); 478(4-5); 496(1-5); 513(4-3/4-5); 599(5-1); 675(3-5/4-5); 700(3-2/3-1); 723(5-4); 767(5-4/5-2); 857(5-4); 992(5-1/5-2); 1056(3-4); 1103(2-4/3-4); 1656(5-4); 1682(3-4); 1810(4-5);	425(4-5); 464(4-5); 478(4-5); 513(4-5); 599(5-1); 675(3-5/4-5); 700(3-2/3-1); 723(5-4); 767(5-4/5-2); 857(5-4); 992(5-1/5-2); 1056; 1103; 1682(3-4); 1810(4-5)

Foram observados que os seguintes pares foram estatisticamente diferentes a 5% com base no espectro da 2ª derivada com normalização:

- Entre a condição 1 e 3, i.e., controlo negativo versus PS-NP: 700 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 1 e 5, i.e., controlo negativo versus colchicina: 599, 992 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 2 e 3, i.e., BPA versus PS-NP: 700 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 2 e 5, i.e., BPA versus colchicina: 767, 992 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 3 e 4, i.e., PS-NP versus BPA+PS-NP: 1682 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 3 e 5, i.e., PS-NP versus colchicina: 675 cm<sup>-1</sup>;
- Entre a condição 4 e 5, i.e., BPA+PS-NP versus colchicina: 425, 464, 478, 513, 675, 723, 767, 857, 1810 cm<sup>-1</sup>.

De uma forma geral, observou-se que o número de pares estatisticamente diferentes nas células é igual ao número de pares estatisticamente diferentes identificadas no meio de cultura às 24h após finda exposição, sendo que três desses pares são diferentes. Além disso, o número de bandas afetadas nas células não difere muito do número de bandas afetadas no meio de cultura às 24h após finda exposição.

Evidenciou-se que o impacto do PS-NP em relação ao controlo negativo é diferente, assim como o impacto do BPA é diferente do PS-NP. Esta condição apresenta apenas uma banda estatisticamente diferente ( $700\text{ cm}^{-1}$ ) que é distinta das identificadas nos meios de cultura.

Observou-se também que o impacto do BPA ou do PS-NP isolado é diferente do impacto da colchicina. A condição do BPA em relação à colchicina apresenta bandas estatisticamente diferentes apesar de no meio de cultura às 24h após finda exposição, esta condição não apresentou bandas estatisticamente diferentes.

A mistura do BPA com o PS-NP teve um impacto diferente do PS-NP isolado e da colchicina. Observou-se que a condição do BPA junto com PS-NP em relação à colchicina apresenta um número maior de bandas afetadas em relação às outras condições, pelo que teve um maior impacto no metabolismo celular. Esta condição apresentou bandas distintas das identificadas no meio de cultura às 24h após finda a exposição.

Observou-se diferenças entre o controlo negativo e a colchicina. Curiosamente, esta condição não teve bandas estatisticamente diferentes nos meios de cultura, o que sugere que tem um efeito mais pronunciado dentro das células.

Interessante que nas células não se obteve pares estatisticamente diferentes para o par do BPA em relação ao controlo negativo, mas no meio de cultura às 24h após finda a exposição houve.

Foram representados gráficos de bigodes para as bandas que apresentaram o maior número de pares estatisticamente diferentes (Fig. 5.7):

- $496\text{ cm}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), que implicou os seguintes pares estatisticamente diferentes: 1 vs 3 ( $p = 0.077$ ), 1 vs 5 ( $p < 0.001$ ), 2 vs 5 ( $p = 0.011$ ), 4 vs 5 ( $p = 0.077$ );
- $513\text{ cm}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), que implicou os seguintes pares estatisticamente diferentes: 1 vs 5 ( $p = 0.052$ ), 2 vs 5 ( $p = 0.054$ ), 4 vs 3 ( $p = 0.055$ ), 4 vs 5 ( $p = 0.001$ ).

As bandas  $496\text{ cm}^{-1}$  e  $513\text{ cm}^{-1}$  pertencem à região *fingerprint* do espetro que reflete uma variedade de vibrações sobrepostas de diferentes moléculas como proteínas, carboidratos, lípidos e ácidos nucleicos<sup>82,84</sup>.

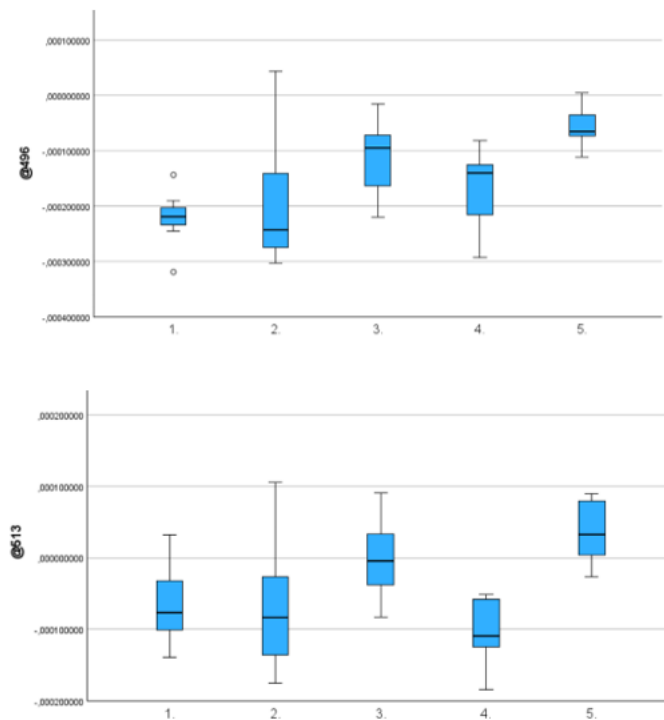


Figura 5.6 - Representação do gráfico de bigodes das bandas com maior número de pares estatisticamente diferentes observadas nas comparações múltiplas das 5 condições, baseadas no espectro das células, com segunda derivada.

### 5.3.2. Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney

Observou-se algumas bandas estatisticamente diferentes a 1% nos espectros das células (tabela 5.8). Verificou-se que a aplicação da normalização resultou em um aumento no número de bandas estatisticamente diferentes, especialmente quando aplicado à correção de linha de base. A segunda derivada também contribuiu para o aumento do número de bandas.

Tabela 5.8 - Comparações de bandas espectrais entre pares de condições por U Mann-Whitney a 1% dos espectros das células, com indicação entre parêntesis dos pares estatisticamente diferentes.

Pré-processamento	Bandas estatisticamente diferentes a 1% (p<0.001)
Correção à linha de base	-
Correção à linha base e normalização	1406 (4-5), 3300 (4-5)
2ª derivada	412 (5-1/5-4), 425 (5-1/5-4), 451 (5-4), 496 (5-1), 513 (5-4), 675 (5-1)
2ª derivada com normalização	464 (4-5), 513 (4-5), 723 (4-5)

Foi observado apenas um par estatisticamente diferente a 1% com base no espectro da segunda derivada com normalização:

- Entre a condição 4 e 5, i.e., BPA+PS-NP versus colchicina: 464, 513 e 723  $\text{cm}^{-1}$ .

A 1% de significância, o impacto do BPA junto com PS-NP é diferente do impacto da colchicina. A combinação do BPA com PS-NP causam um efeito possivelmente maior no metabolismo das células.

## 6. Conclusão

A exposição aos NPs e BPA acontece no nosso cotidiano, mesmo em concentrações pequenas, e a sua contaminação pode ocorrer através de diversas fontes, especialmente por produtos de uso diário. Diversos estudos de biomonitorização, observaram que estes dois compostos podem ser prejudiciais à saúde humana, podendo danificar o material genético das células, o que pode levar a doenças. A identificação de substâncias químicas, ou fatores que causam genotoxicidade, pode ser avaliada através da técnica de CBMN. No entanto, é uma técnica de execução complexa, apresenta inter e intravariabilidade nos resultados e necessita de especialização humana, que por vezes não se encontra em hospitais locais e até mesmo laboratórios clínicos. Deste modo, é crucial desenvolver métodos alternativos para a análise de genotoxicidade que sejam mais simples, económicos e passíveis de serem automatizados.

Neste trabalho, foi avaliada a aplicação de espectroscopia FTIR como um novo método de biomonitorização da genotoxicidade de PS-NPs e BPA. Este estudo é uma continuação de um projeto anterior que analisou os efeitos genotóxicos da exposição ao BPA e PS-NPs na linha celular gástrica humana GP202, utilizando o método CBMN. No presente trabalho, as células foram expostas às concentrações de PS-NPs (200 µg/mL) e BPA (1 ng/mL) de forma individual e combinada (1 ng/mL BPA + 200 µg/mL PS-NP) e avaliou-se por espectroscopia FTIR o meio de cultura, em dois momentos diferentes, designados por 0h após exposição e 24h após finda a exposição, e os *pellet* celulares.

Através do estudo dos efeitos citotóxicos e genotóxicos por CBMN, não foram observados efeitos na viabilidade celular em nenhuma das condições de exposição, nem houve diferenças estatisticamente significativas nos biomarcadores de dano de DNA, no entanto, foi observada uma tendência de aumento dos parâmetros avaliados (MN, NPB e NBUD). Foi feita uma análise univariada de várias bandas espectrais após diversos pré-processamentos espectrais, como sejam de correção de linha de base, correção de linha de base com normalização, 2ª derivada e 2ª derivada com normalização. Foram identificadas diversas bandas espectrais estatisticamente diferentes a 5% e 10% de significância. Com a normalização foi possível identificar um maior número de bandas afetadas quer no meio de cultura quer nas células. Em relação aos meios de cultura, às 0h após exposição, o número de bandas afetadas foi maior do que às 24h após finda a exposição. Com base na análise do espetro da 2ª derivada normalizada, observou-se pares de condições que apresentaram bandas

estatisticamente diferentes às 24h após finda a exposição que não foram observadas às 0h após exposição. Nos mesmos pares de condições observados às 0h após exposição e 24h após finda a exposição foram identificadas bandas diferentes, o que indica uma alteração no metabolismo celular. Observou-se que a exposição aos compostos estudados resultou num alto impacto metabólico, visto que levou a uma alteração significativa de várias biomoléculas (como proteínas, lípidos, carboidratos). Em relação às células, foi possível observar bandas estatisticamente diferentes a 10% e 5% de significância. Através de comparações entre pares de condições, foi possível obter bandas estatisticamente diferentes a 1% de significância quer nos meios de cultura quer nas células. Toda esta informação foi adquirida de forma rápida, simples e económica através da análise espectroscópica.

Em resumo, foi possível avaliar os efeitos metabólicos provocados pelo BPA e NPs e a sua exposição combinada, nas células gástricas, utilizando espectroscopia FTIR, mesmo com uma amostra reduzida. Isto demonstra a sensibilidade e especificidade da técnica, sugerindo o seu potencial como método para monitorizar o risco biológico da exposição a substâncias químicas.

## **7. Limitações e Perspetivas Futuras**

A principal limitação deste estudo foi a pequena dimensão da amostra, com apenas três réplicas biológicas por ensaio. O ideal seria realizar o ensaio com pelo menos cinco réplicas, ou mais, devido à alta variabilidade biológica, o que dificultou a avaliação do impacto pelos métodos convencionais.

Este trabalho abre caminho para novas abordagens e aplicações com a espectroscopia FTIR. Pode ser combinada com outras técnicas analíticas que avaliam alterações moleculares, como citometria de fluxo e proteómica, que pode proporcionar uma caracterização mais completa dos efeitos metabólicos. Estudos futuros podem explorar os efeitos da exposição com outros tipos de compostos químicos para demonstrar a sua aplicabilidade universal, e com isso, estabelecer protocolos padronizados para a utilização da espectroscopia FTIR na avaliação da genotoxicidade, para garantir a sua reprodutibilidade e comparabilidade dos resultados.

## 8. Referências Bibliográficas

1. Alves IA. In vitro combined toxicity of hexavalent chromium , nickel and benzo ( a ) pyrene in human lung cells. 2021;
2. Bajt O. From plastics to microplastics and organisms. *FEBS Open Bio.* 2021;11(4):954–66.
3. Yang X, Man YB, Wong MH, Owen RB, Chow KL. Environmental health impacts of microplastics exposure on structural organization levels in the human body. *Sci Total Environ.* 2022 Jun 15;825:154025.
4. Bernardete C, Brito S De. 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 Efeitos citotóxicos e genotóxicos da ex. 2023;
5. Eales J, Bethel A, Galloway T, Hopkinson P, Morrissey K, Short RE, et al. Human health impacts of exposure to phthalate plasticizers: An overview of reviews. *Environ Int* [Internet]. 2022;158(September 2021):106903. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106903>
6. Lai H, Liu X, Qu M. Nanoplastics and Human Health: Hazard Identification and Biointerface. *Nanomaterials.* 2022;12(8).
7. Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA J.* 2016 Jun 1;14(6).
8. Sharma VK, Ma X, Lichtfouse E, Robert D. Nanoplastics are potentially more dangerous than microplastics. *Environ Chem Lett* [Internet]. 2023;21(4):1933–6. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01539-1>
9. Alqahtani S, Alqahtani S, Saquib Q, Mohiddin F. Toxicological impact of microplastics and nanoplastics on humans: understanding the mechanistic aspect of the interaction. *Front Toxicol.* 2023 Jul 14;5:1193386.
10. Yang SS, Brandon AM, Xing DF, Yang J, Pang JW, Criddle CS, et al. Progresses in Polystyrene Biodegradation and Prospects for Solutions to Plastic Waste Pollution. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2024 May 22];150(1):012005. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/150/1/012005>
11. Zhang R, Silic MR, Schaber A, Wasel O, Freeman JL, Sepúlveda MS. Exposure route affects the distribution and toxicity of polystyrene nanoplastics in zebrafish. *Sci Total Environ.* 2020 Jul 1;724:138065.
12. Choudhury A, Simnani FZ, Singh D, Patel P, Sinha A, Nandi A, et al. Atmospheric microplastic and nanoplastic: The toxicological paradigm on the cellular system. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2023;259(March):115018. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115018>
13. Gonkowski S. Bisphenol A (BPA)-Induced Changes in the Number of Serotonin-Positive Cells in the Mucosal Layer of Porcine Small Intestine—the Preliminary Studies. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2024 May 3];21(3). Available

from: /pmc/articles/PMC7037014/

14. Czarnywojtek A, Borowska M, Dyrka K, Moskal J, Kościński J, Krela-Kaźmierczak I, et al. The influence of various endocrine disruptors on the reproductive system. *Endokrynol Pol* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2024 Apr 21];74(3):221–33. Available from: [https://journals.viamedica.pl/endokrynologia\\_polska/article/view/EP.a2023.0034/72680](https://journals.viamedica.pl/endokrynologia_polska/article/view/EP.a2023.0034/72680)
15. Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) | Endocrine Society [Internet]. [cited 2024 May 23]. Available from: <https://www.endocrine.org/patient-engagement/endocrine-library/edcs>
16. Sonavane M, Gassman NR. c BPA's complex mechanism and health outcomes. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2019 May 28 [cited 2024 Apr 16];49(5):371. Available from: /pmc/articles/PMC6823117/
17. Anet A, Olakkaran S, Kizhakke Purayil A, Hunasanahally Puttaswamygowda G. Bisphenol A induced oxidative stress mediated genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *J Hazard Mater*. 2019 May 15;370:42–53.
18. Phillips DH, Arlt VM. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS* [Internet]. 2009 [cited 2024 Apr 7];99:87–110. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19157059/>
19. Aghajanpour-Mir SM, Zabihi E, Akhavan-Niaki H, Keyhani E, Bagherizadeh I, Biglari S, et al. The Genotoxic and Cytotoxic Effects of Bisphenol-A (BPA) in MCF-7 Cell Line and Amniocytes. *Int J Mol Cell Med* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jun 1];5(1):19. Available from: /pmc/articles/PMC4916780/
20. Schröter L, Ventura N. Nanoplastic Toxicity: Insights and Challenges from Experimental Model Systems. *Small*. 2022;18(31).
21. Ladeira C, Smajdova L. The use of genotoxicity biomarkers in molecular epidemiology: applications in environmental, occupational and dietary studies. *AIMS Genet* [Internet]. 2017 Oct [cited 2024 Jun 1];04(03):166–91. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ejournals/html/10.3934/genet.2017.3.166>
22. Ladeira C, Araújo R, Ramalhe L, Teixeira H, Calado CRC. Blood molecular profile to predict genotoxicity from exposure to antineoplastic drugs. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2023;891(August).
23. Fadlelmoula A, Pinho D, Carvalho VH, Catarino SO, Minas G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 May 8];13(2). Available from: /pmc/articles/PMC8879834/
24. Ganzoury MA, Allam NK, Nicolet T, All C. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2015;50:1–8. Available from: <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.073>
25. Chen J, Xu Z, Liu Y, Mei A, Wang X, Shi Q. Cellular absorption of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization and the toxicity to RAW264.7 macrophage cells. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 18];252. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114574>
26. Microplastics | UNEP - UN Environment Programme [Internet]. [cited 2024 Apr

- 10]. Available from: <https://www.unep.org/resources/report/microplastics>
27. Banerjee A, Shelver WL. Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review. *Sci Total Environ*. 2021 Feb 10;755:142518.
  28. What are macroplastics? | Norwegian Centre against Marine Litter [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.marfo.no/en/plast-i-havet/hva-er-makroplast/>
  29. What are microplastics and macroplastics? | The Ocean Cleanup [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://theoceancleanup.com/faq/what-are-microplastics-and-macroplastics-and-why-may-they-be-harmful/>
  30. Nanopinion - European Observatory for Nanomaterials [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://euon.echa.europa.eu/pt/nanopinion/-/blogs/are-nanoplastics-hazardous-the-way-forward-to-overcome-the-uncertainties-of-risk-assessment>
  31. Pérez-Reverón R, Álvarez-Méndez SJ, González-Sálamo J, Socas-Hernández C, Díaz-Peña FJ, Hernández-Sánchez C, et al. Nanoplastics in the soil environment: Analytical methods, occurrence, fate and ecological implications. *Environ Pollut* [Internet]. 2023 Jan 15 [cited 2024 Jun 21];317. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36481462/>
  32. Kindrebeogo M, Ouarda Y, Karimi Estahbanati MR, Drogui P, Tyagi RD. Nanoplastics removal from spiked laundry wastewater using electro-peroxidation process. *Chemosphere*. 2023 Nov 1;341:139963.
  33. Yu F, Jin F, Cong Y, Lou Y, Li Z, Li R, et al. Bisphenol A decreases the developmental toxicity and histopathological alterations caused by polystyrene nanoplastics in developing marine medaka *Oryzias melastigma*. *Chemosphere*. 2023 Sep 1;336:139174.
  34. Joksimovic N, Selakovic D, Jovicic N, Jankovic N, Pradeepkumar P, Eftekhari A, et al. Nanoplastics as an Invisible Threat to Humans and the Environment. *J Nanomater*. 2022;2022.
  35. European Commission. Nanoplastics: state of knowledge and environmental and human health impacts [Internet]. Publication Office of the European Union. 2023. Available from: <https://ec.europa.eu/science->
  36. Sangkham S, Faikhaw O, Munkong N, Sakunkoo P, Arunlertaree C, Chavali M, et al. A review on microplastics and nanoplastics in the environment: Their occurrence, exposure routes, toxic studies, and potential effects on human health. *Mar Pollut Bull*. 2022 Aug 1;181:113832.
  37. Osuna-Laveaga DR, Ojeda-Castillo V, Flores-Payán V, Gutiérrez-Becerra A, Moreno-Medrano ED. Micro- and nanoplastics current status: legislation, gaps, limitations and socio-economic prospects for future. *Front Environ Sci*. 2023 Aug 22;11:1241939.
  38. Abdolahpur Monikh F, Foss Hansen S, Vijver MG, Kentin E, Bille Nielsen M, Baun A, et al. Can Current Regulations Account for Intentionally Produced Nanoplastics? *Cite This Environ Sci Technol* [Internet]. 2022 [cited 2024 Jun 21];2022:3839. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00965>
  39. Sorensen RM, Kanwar RS, Jovanovi B. Past, present, and possible future policies on plastic use in the United States, particularly microplastics and nanoplastics: A review. *Integr Environ Assess Manag* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 Jun 21];19(2):474–88. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ieam.4678>

40. Gigault J, Halle A ter, Baudrimont M, Pascal PY, Gauffre F, Phi TL, et al. Current opinion: What is a nanoplastic? *Environ Pollut*. 2018 Apr 1;235:1030–4.
41. Wang F, Zhang M, Sha W, Wang Y, Hao H, Dou Y, et al. Sorption behavior and mechanisms of organic contaminants to nano and microplastics. *Molecules*. 2020;25(8).
42. Kopac T. Protein corona, understanding the nanoparticle–protein interactions and future perspectives: A critical review. *Int J Biol Macromol*. 2021 Feb 1;169:290–301.
43. Li D, Ji J, Yuan Y, Wang D. Toxicity comparison of nanopolystyrene with three metal oxide nanoparticles in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 2020 Apr 1;245:125625.
44. Chae Y, An YJ. Effects of micro- and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives. *Mar Pollut Bull*. 2017 Nov 30;124(2):624–32.
45. Pitt JA, Kozal JS, Jayasundara N, Massarsky A, Trevisan R, Geitner N, et al. Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*. 2018 Jan 1;194:185–94.
46. Pironti C, Notarstefano V, Ricciardi M, Motta O, Giorgini E, Montano L. First Evidence of Microplastics in Human Urine, a Preliminary Study of Intake in the Human Body. *Toxics* 2023, Vol 11, Page 40 [Internet]. 2022 Dec 30 [cited 2024 Jun 21];11(1):40. Available from: <https://www.mdpi.com/2305-6304/11/1/40/htm>
47. Schirinzi GF, Pérez-Pomeda I, Sanchís J, Rossini C, Farré M, Barceló D. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environ Res*. 2017 Nov 1;159:579–87.
48. Koelmans AA, Besseling E, Wegner A, Foekema EM. Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: A model analysis. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2013 Jul 16 [cited 2024 Jun 21];47(14):7812–20. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es401169n>
49. Bisphenol A (BPA) | Description, Biological Effects, & Environmental Effects | Britannica [Internet]. [cited 2024 Apr 29]. Available from: <https://www.britannica.com/science/bisphenol-A>
50. National Institute of Environmental Health Sciences: Bisphenol A (BPA) [Internet]. [cited 2024 Feb 12]. Available from: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-bpa>
51. Risk Management for Bisphenol A (BPA) | US EPA [Internet]. [cited 2024 Apr 20]. Available from: <https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/risk-management-bisphenol-bpa>
52. Gonkowski S. Molecular Sciences Communication Bisphenol A (BPA)-Induced Changes in the Number of Serotonin-Positive Cells in the Mucosal Layer of Porcine Small Intestine-the Preliminary Studies. [cited 2024 Feb 18]; Available from: [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms)
53. Oppt. Bisphenol A Action Plan. [cited 2024 Jun 12]; Available from: <http://www.hhs.gov/safety/bpa/>.
54. National Institute of Environmental Health Sciences: Bisphenol A (BPA)

- [Internet]. [cited 2024 Apr 20]. Available from:  
<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-bpa>
55. Bisphenol A | EFSA [Internet]. [cited 2024 Apr 21]. Available from:  
<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>
  56. REGULAMENTO (UE) 2018/ 213 DA COMISSÃO - de 12 de fevereiro de 2018 - relativo à utilização de bisfenol A em vernizes e em revestimentos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que altera o Regulamento (UE) n.º 10/ 2011 no que se refere à utilização desta substância em materiais de plástico destinados a entrar em contacto com alimentos.
  57. Bisfenóis - ECHA [Internet]. [cited 2024 Jun 24]. Available from:  
<https://echa.europa.eu/pt/hot-topics/bisphenols>
  58. Wang L, Zhu Y, Gu J, Yin X, Guo L, Qian L, et al. The toxic effect of bisphenol AF and nanoplastic coexposure in parental and offspring generation zebrafish. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2023;251(January):114565. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114565>
  59. Ma Y, Liu H, Wu J, Yuan L, Wang Y, Du X, et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ Res*. 2019 Sep 1;176:108575.
  60. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod*. 2002;17(11):2839–41.
  61. Wang W, Hafner KS, Flaws JA. In utero bisphenol A exposure disrupts germ cell nest breakdown and reduces fertility with age in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 Apr 15;276(2):157–64.
  62. Ren N, Atyah M, Chen WY, Zhou CH. The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: Testing methods and clinical applications. *J Transl Med*. 2017;15(1):1–13.
  63. Møller P, Roursgaard M. Exposure to nanoplastic particles and DNA damage in mammalian cells. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2023;792(August).
  64. Ocde O. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Test No 487 Vitro Mamm Cell Micronucleus Test. 2014;(July).
  65. Ladeira C, Viegas S. Human Biomonitoring – An overview on biomarkers and their application in Occupational and Environmental Health. *Biomonitoring*. 2016 Dec 20;3(1).
  66. Fenech M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes (Basel)* [Internet]. 2020 [cited 2024 Feb 17];11. Available from:  
[www.mdpi.com/journal/genes](http://www.mdpi.com/journal/genes)
  67. Araújo R, Ramalheite L, Paz H, Ladeira C, Calado CRC. A new method to predict genotoxic effects based on serum molecular profile. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2021;255.
  68. OECD/OCDE 487. [cited 2024 Jun 24]; Available from:  
<http://www.oecd.org/termsandconditions/>
  69. Speit G, Ladeira C, Linsenmeyer R, Schütz P, Högel J. Re-evaluation of a

- reported increased micronucleus frequency in lymphocytes of workers occupationally exposed to formaldehyde. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2012;744(2):161–6.
70. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res Mutat Res*. 2000 Aug 1;463(2):111–72.
  71. Sioen S, Cloet K, Vral A, Baeyens A. The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Human Isolated Fresh and Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Pers Med* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2024 May 7];10(3):1–12. Available from: [/pmc/articles/PMC7564880/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3548880/)
  72. Su KY, Lee WL. Fourier transform infrared spectroscopy as a cancer screening and diagnostic tool: A review and prospects. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1).
  73. Fadlelmoula A, Pinho D, Carvalho VH, Catarino SO, Minas G. Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip micromachines Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. 2022 [cited 2024 May 8]; Available from: <https://doi.org/10.3390/mi13020187>
  74. FTIR Analysis | RTI Laboratories [Internet]. [cited 2024 Jun 24]. Available from: <https://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/>
  75. Teixeira HS da P. Pesquisa de biomarcadores de genotoxicidade em sangue e soro por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. *Inst Politécnico Lisboa, Esc Super Tecnol da Saúde Lisboa* [Internet]. 2018; Available from: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/10838>
  76. Bunaciu AA, Hoang VD, Aboul-Enein HY. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. *Crit Rev Anal Chem*. 2015;45(2):156–65.
  77. Campanale C, Savino I, Massarelli C, Uricchio VF. Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Assess the Degree of Alteration of Artificially Aged and Environmentally Weathered Microplastics. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2024 Jun 24];15(4). Available from: [/pmc/articles/PMC9961336/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41336/)
  78. 7 Applications of FTIR Analysis - Richmond Scientific [Internet]. [cited 2024 Jun 24]. Available from: <https://www.richmondscientific.com/what-are-the-applications-of-ftir>
  79. Fortin MF. O processo de investigação. Loures: Lusociência; 1999.
  80. Gärtner F, David L, Seruca R, Machado JC, Sobrinho-Simões M. Establishment and characterization of two cell lines derived from human diffuse gastric carcinomas xenografted in nude mice. *Virchows Arch*. 1996;428(2):91–8.
  81. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUMAN MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res* [Internet]. 1999 Jul 16 [cited 2024 Jul 10];428(1–2):271–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10517999/>
  82. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2012 [cited 2024 Aug 15];2(1):1. Available from: [/pmc/articles/PMC3236568/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2326568/)
  83. Tamm LK, Tatulian SA. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid

bilayers. *Q Rev Biophys.* 1997;30(4):365–429.

84. Marques V, Cunha B, Couto A, Sampaio P, Fonseca LP, Aleixo S, et al. Characterization of gastric cells infection by diverse *Helicobacter pylori* strains through Fourier-transform infrared spectroscopy. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2019;210:193–202. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.11.001>