



**CAPTAR**  
ciência e ambiente para todos

volume 10 • 2021 • art. 4

## Avaliação do potencial citotóxico de microplásticos em linhas celulares intestinais, hepáticas e neuronais

Os microplásticos (MPs) são uma classe emergente de contaminantes, que resultam da libertação directa de pequenas partículas que constituem total ou parcialmente objetos de uso quotidiano ou da deterioração de plásticos que originalmente possuem maiores dimensões. O polietileno (PE), a poliamida (PA-nylon 12) e o policloreto de vinilo (PVC) são três polímeros muito comumente utilizados no fabrico de sacos de plástico, recipientes e utensílios domésticos, produtos de higiene pessoal, componentes automóveis e de eletrónica e materiais de construção. Devido à sua ubiquidade (resultante da extensa utilização), os seres vivos estão constantemente expostos a estes contaminantes. No caso humano, a ingestão diária de microplásticos é uma das formas mais frequentes de exposição, tornando assim fundamental avaliar a sua potencial toxicidade. Neste trabalho a citotoxicidade de PE, PA-nylon 12 e PVC foram avaliadas em três linhas celulares distintas: células do intestino (Caco-2), do fígado (HepG2) e neurónios (N27). De uma forma geral, os microplásticos testados apresentaram toxicidade para as linhas celulares N27 e HepG2, com exceção do PE nesta última. Por outro lado, para as células Caco-2 não foram registadas reduções significativas na viabilidade celular.

### Palavras-chave

contaminantes emergentes  
citotoxicidade  
Caco-2  
HepG2  
N27

João V. Valente<sup>1,2,3</sup>

Rafael A. Barros<sup>2,3</sup>

Ana C. Cristovão<sup>3,4</sup>

M. Ramiro Pastorinho<sup>2,5</sup>

Ana C. A. Sousa<sup>2,6\*</sup>

<sup>1</sup> CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

<sup>2</sup> Núcleo de Estudos em Saúde Ambiental (NuESA), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Portugal.

<sup>3</sup> Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.

<sup>4</sup> NeuroSoV - UBImedical, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>5</sup> Departamento de Ciências Médicas e *Comprehensive Health Research Center* (CHRC), Universidade de Évora, Évora, Portugal.

<sup>6</sup> Departamento de Biologia e *Comprehensive Health Research Center* (CHRC), Universidade de Évora, Évora, Portugal.

\*acsousa@uevora.pt

ISSN 1647-323X

Artigo em acesso aberto sob [licença CC-BY](#)

© 2021 Autores

## INTRODUÇÃO

Os plásticos são materiais versáteis, resultantes de um processo de inovação tecnológica, criados com o objetivo de satisfazer as necessidades e solucionar problemas concretos da sociedade, incluindo, por exemplo, o acesso a água potável, à proteção de alimentos, a melhoria dos cuidados de higiene pessoal ou a melhoria da eficiência energética das habitações. Assim, com o crescimento populacional mundial registou-se um aumento na procura deste tipo de produtos (PlasticsEurope 2020). De facto, em 2019, a produção de plástico atingiu aproximadamente os 370 milhões de toneladas em todo o mundo, das quais 57,9 Mt foram produzidas só na Europa (PlasticsEurope 2020). Devido à elevada resistência química e térmica, os plásticos não são facilmente degradáveis e, conseqüentemente, acabam por se acumular no meio ambiente (da Costa, Santos et al. 2016). Para além disso, muitos plásticos são desenhados apenas para uma única utilização, sendo imediatamente descartados após o seu uso (Oliveira, Almeida et al. 2019). Por exemplo, na Europa, em 2018, recolheram-se 29,1 milhões de toneladas de plástico de uso único, dos quais apenas 32,5% foram reciclados (a forma mais adequada para tratar estes materiais) (Hamilton, Feit et al. 2019, PlasticsEurope 2020). Para além disso, com a pandemia global provocada pela COVID-19, registou-se um aumento do consumo de materiais descartáveis e um aumento das compras online e, portanto, um aumento na quantidade de resíduos de plásticos resultantes do acondicionamento das encomendas (Pinto da Costa, Rocha-Santos et al. 2020).

Os plásticos durante o seu tempo de vida podem, através de mecanismos de deterioração provocados por fatores externos, dar origem a partículas de tamanho mais reduzido, incluindo microplásticos.

Os microplásticos (MPs) são, usualmente, definidos como partículas de tamanho inferior a 5 mm (Arthur, Baker et al. 2009), contudo ainda não existe consenso internacional acerca do tamanho a partir do qual se deve considerar uma partícula como 'microplástico' (Koehler, Anderson et al. 2015). Isto deve-se à inexistência de métodos padrão validados para a sua análise (Hale 2017, Costa, Pinto da Costa et al. 2018, Rochman, Brookson et al. 2019, Schwaferts, Niessner et al. 2019). Quanto à sua origem, os MPs podem-se classificar em primários e secundários (Figura 1).

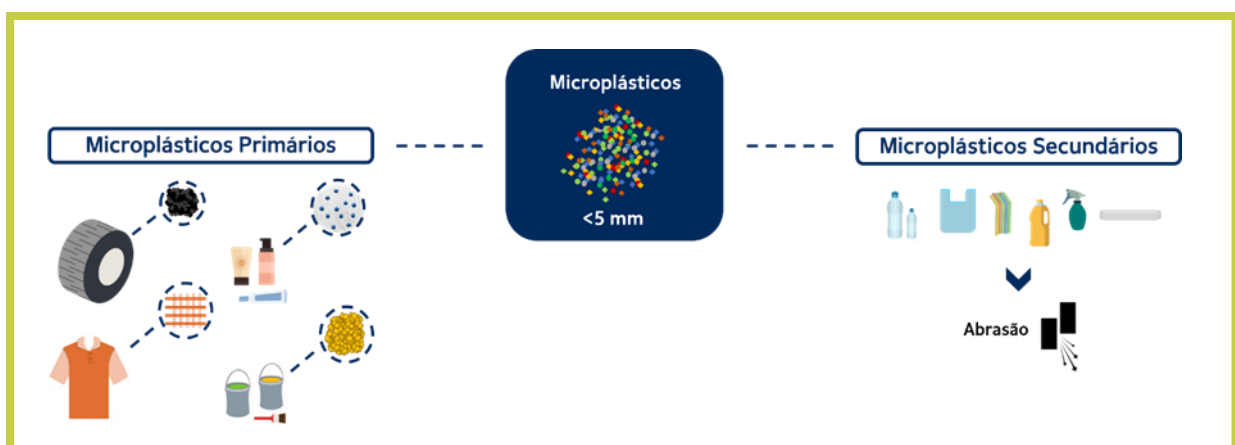


FIGURA 1: Classificação dos microplásticos (MPs) de acordo com a sua origem. Fonte: website vexels.com.

Os microplásticos primários são libertados diretamente para o meio ambiente como pequenas partículas, sendo que as principais fontes são a lavagem de roupas sintéticas (35%), a abrasão de pneus de veículos

automóveis durante a condução (28%) e os MPs adicionados intencionalmente a produtos de higiene pessoal, como por exemplo microesferas em esfoliantes faciais (2%) (European Parliament 2019). Já os secundários são gerados no meio ambiente e resultam da degradação de objetos de plástico, como por exemplo sacos de plástico, garrafas de plástico ou redes de pesca (European Parliament 2019, Rochman, Brookson et al. 2019). O polietileno (PE), poliamida (PA, também conhecida vulgarmente por nylon) e policloreto de vinilo (PVC) são três dos polímeros mais comuns, sendo utilizados, por exemplo, em materiais de construção, embalagens, produtos de higiene e cuidado pessoal e vestuário (PlasticsEurope 2019). Uma vez que as partículas geradas (primária ou secundariamente) a partir destes produtos e libertadas no meio ambiente compreendem tamanhos na escala micro, podem ser ingeridas por organismos (independentemente do nível trófico que ocupam na cadeia alimentar) (Lusher, Welden et al. 2017). Desta forma, a concentração de MPs tende a aumentar ao longo de toda a cadeia trófica, resultando na bioacumulação e, mais tarde, na biomagnificação destas partículas nos níveis superiores da cadeia alimentar, contribuindo, inevitavelmente, para a exposição em humanos (Rochman, Brookson et al. 2019).

Durante muito tempo, os MPs foram considerados como inertes. No entanto, estudos recentes sugerem que estas pequenas partículas têm potencial para provocar efeitos adversos em organismos (Galloway 2015, da Costa, Duarte et al. 2017, Anbumani and Kakkar 2018, Ogonowski, Gerdes et al. 2018, Lu, Luo et al. 2019). Para isso contribuem a elevada área superficial e ubiquidade, duas importantes características que, cumulativamente, são responsáveis pela sua citotoxicidade, aumentos de stress oxidativo e potencial inflamatório.

No entanto, a toxicidade dos microplásticos está associada não só ao tamanho e polímero utilizado, mas também aos compostos químicos que são adicionados durante o processo de fabrico e/ou que são adsorvidos durante o seu tempo de vida. Durante o processo de fabrico, vários aditivos tóxicos são adicionados aos plásticos incluindo por exemplo plastificantes (BBPs (do inglês *Benzyl butyl phthalate*); DEHPs (do inglês *Bis(2-ethylhexyl) phthalate*)), retardantes de chama (PBDEs (do inglês *polybrominated diphenyl ethers*); TBBAPAs (do inglês *Tetrabromobisphenol A*)); estabilizadores (BPA (do inglês *Bisphenol A*), fenóis), corantes ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Co}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ), endurecedores (formaldeído, MDAs (do inglês *4,4'-Methylenedianiline*)), agentes antiestáticos (aminas, PEGs (do inglês *Polyethylene glycol*)) e adjuvantes (ésteres, amidas) (Pinto da Costa, Rocha-Santos et al. 2020). Estes aditivos podem sofrer lixiviação, e dada a sua toxicidade são prejudiciais para os seres humanos e para a vida selvagem (Koehler, Anderson et al. 2015, Rochman, Brookson et al. 2019, Prata, da Costa et al. 2020). Por outro lado, uma vez no ambiente, os microplásticos podem adsorver outros poluentes, pois a sua estrutura química foi danificada, por exemplo, por radiação, e as cadeias de polímeros tornam-se disponíveis para se ligarem a contaminantes ambientais, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), diclorodifeniltricloroetanos (DDT) e metais (Rochman, Brookson et al. 2019, Prata, da Costa et al. 2020). Assim, os microplásticos funcionam como uma “esponja química” que, quando em contacto com fluídos biológicos, podem libertar contaminantes ambientais, tornando-os biodisponíveis, e causar efeitos tóxicos.

A exposição a MPs ocorre por meio de três vias diferentes: ingestão, inalação e contacto dérmico, tal como sumariado na Figura 2 (Revel, Châtel et al. 2018).

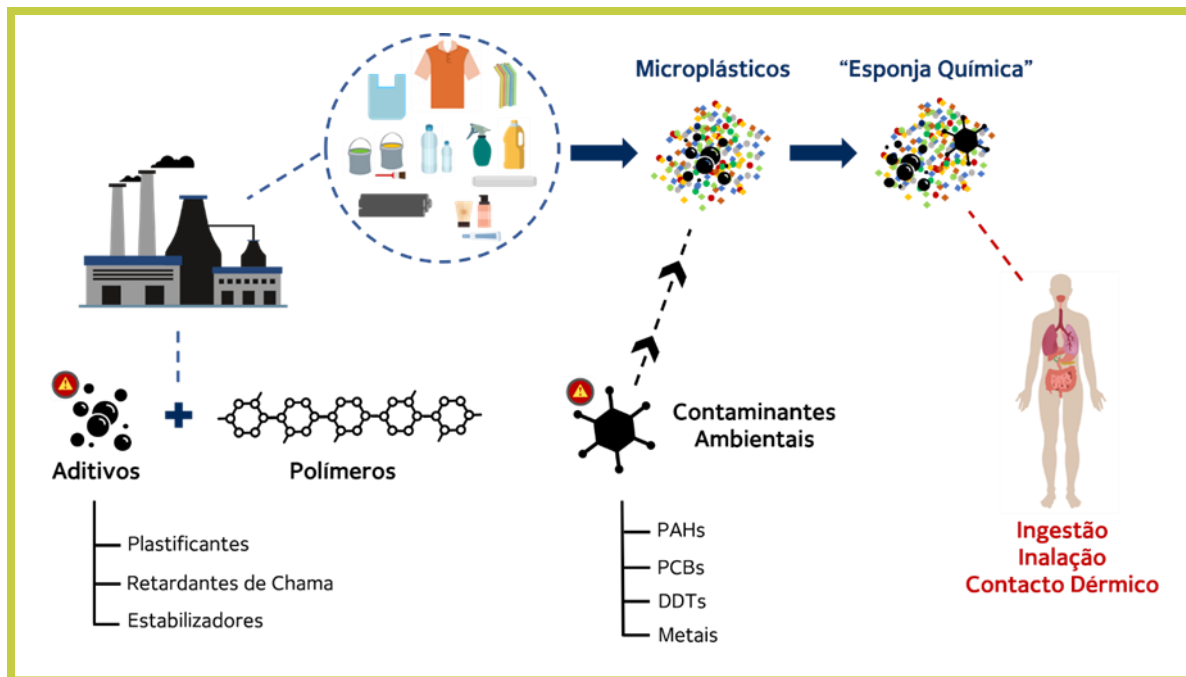


FIGURA 2: Representação esquemática das principais fontes e vias de exposição a microplásticos. Fonte: website vexels.com.

A **ingestão** inclui normalmente alimentos contaminados com MPs, (por exemplo bivalves, peixe, água engarrafada, cerveja e sal) e estima-se que apenas pelo consumo de bivalves, um cidadão Europeu está exposto a 11000 MPs por ano (Van Cauwenberghe and Janssen 2014). Contudo, a ingestão de pó doméstico representa também uma importante fonte de exposição e deve ser tida em conta, já que pode ser mais significativa do que a ingestão de alimentos contaminados (Catarino, Macchia et al. 2018). Apesar da literatura disponível neste campo ser limitada, foi reportado que partículas de tamanho inferior 10 µm podem chegar ao sistema gastrointestinal e alterar as condições da resposta inflamatória e também a composição e metabolismo do microbioma intestinal (Salim, Kaplan et al. 2014).

A **inalação** resulta da libertação e ressuspensão de partículas de MPs de menor densidade do que o ar que têm como principal fonte a abrasão de objetos de plástico (Dris 2015), sendo expectável que um indivíduo adulto do sexo masculino inale cerca de 272 MPs por dia (Vianello, Jensen et al. 2019). Mas este valor pode variar com a estação do ano, a frequência de limpeza das casas, os materiais de construção e o tipo de mobília (Prata, da Costa et al. 2020).

A **exposição dérmica** parece ter menor impacto ou incidência (Prata, da Costa et al. 2020) e ocorre quando o ser humano tem contacto com água contaminada com microplásticos durante o banho, ou através de produtos de higiene pessoal, como por exemplo, exfoliantes. Contudo, apenas partículas de tamanho inferior a 100 nm (nanoplásticos) conseguem ser absorvidas e passar a barreira dérmica da pele, por isso, este fenómeno é pouco comum (Revel, Châtel et al. 2018). Não obstante, já foram detetadas partículas de nanoplásticos em três exfoliantes comerciais (Hernandez, Yousefi et al. 2017). Estas partículas incluem

monómeros e aditivos de plásticos, dos quais se destacam o Bisfenol A e os ftalatos que actuam como disruptores endócrinos (Galloway 2015, Prata, da Costa et al. 2020).

Após a exposição, os microplásticos podem provocar efeitos adversos a partir do momento que entram para o organismo. No entanto, a informação em relação aos efeitos, principalmente citotóxicos, nas estruturas biológicas de destino é limitada. Assim, com este trabalho pretende-se explorar a citotoxicidade dos microplásticos em linhas celulares de intestino, fígado e cérebro.

## METODOLOGIA

### **Preparação de soluções com microplásticos**

Neste trabalho foram utilizados os seguintes microplásticos: polietileno (PE em pó com superfície modificada; 40-48 µm de tamanho de partícula; Sigma; CAS 9002-88-4), poliamida (PA-nylon 12 em pó; 10-50 µm de tamanho de partícula; Goodfellow; AM376010) e o policloreto de vinilo (PVC em pó; Mw ~80,000; Sigma; CAS 9002-86-2).

De forma a prevenir contaminações, todo o procedimento de preparação das soluções de MPs, com exceção da pesagem, foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar.

Com base em dados retirados da literatura, a gama de concentrações selecionada para este trabalho foi: 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 2000 e 4000 µg.mL<sup>-1</sup> (Espinosa, Garcia Beltran et al. 2018). Assim, para cada MP foi preparada uma solução stock em NaCl (VWR; 98%) com uma concentração de 100 g.L<sup>-1</sup>, esta solução stock foi usada para preparar uma 2ª solução stock de concentração 10 g.L<sup>-1</sup>. Por fim, foram preparados 2 mL de cada uma das soluções de teste (0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 2000 e 4000 µg.mL<sup>-1</sup>) através de diluições sucessivas.

### **Ensaio com Caco-2**

As células de carcinoma colorretal humano (Caco-2) foram mantidas em meio DMEM-HG (Sigma) suplementado com 10% FBS (do inglês *Fetal Bovine Serum*) e 1 mL.L<sup>-1</sup> pen/strep (10 U/mL penicilina e 10 µg/mL estreptomicina; Gibco) para promover o crescimento celular e prevenir a contaminação por microrganismos, respetivamente. As células foram cultivadas em placas de 100 mm x 20 mm (Corning) e mantidas a 37 °C em atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>. Quando a cultura chegou aproximadamente 90-100% de confluência, as células foram tripsinizadas com uma solução de tripsina/EDTA (0.004 g tripsina em 0.1 g EDTA; Panreac, 99%) dissolvido em 500 mL de PBS (do inglês *Phosphate-buffered saline*). Depois estas células foram cultivadas em placas de 96 poços (Zenbio) com uma densidade de 1x10<sup>4</sup> células/poço. Após 48 h, as células foram expostas durante 24 h às diferentes concentrações de PE, PA-nylon 12 e PVC. Para cada concentração foram realizadas 5 réplicas nos 3 testes independentes (N=3) executados.

### **Ensaio com HepG2**

As células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) cresceram em meio de expansão HepG2 (Cellular Engineering Technologies) suplementado com 10% FBS e 0.1 mL.L<sup>-1</sup> pen/strep. As células foram cultivadas em frascos-T de 75 cm<sup>2</sup> (Cell Applications, Inc.) revestidos com colagénio (Sigma; 9007-34-5) e mantidas a

37 °C em atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>. Quando a cultura chegou aproximadamente 70-80% de confluência, as células foram tripsinizadas com uma solução tripsina/EDTA (0.004 g tripsina em 0.1 g EDTA; Panreac, 99%). Depois estas células foram cultivadas em placas de 96 poços com uma densidade de 1x10<sup>4</sup> células/poço. Após 48 h, as células foram expostas durante 24 h às diferentes concentrações de PE, PA-nylon 12 e PVC. Para cada concentração foram realizadas 5 réplicas nos 3 testes independentes (N=3) executados.

### Ensaio com N27

As células de neurónios dopaminérgicos de ratinhos (N27) cresceram em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% FBS e 1 mL.L<sup>-1</sup> pen/strep. As células foram cultivadas em placas de 100 mm x 20 mm e mantidas a 37 °C em atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>. Quando a cultura chegou aproximadamente 70-80% de confluência, as células foram tripsinizadas com uma solução tripsina/EDTA (0.004 g tripsina em 0.1 g EDTA; Panreac, 99%). Depois estas células foram cultivadas em placas de 96 poços com uma densidade de 1x10<sup>4</sup> células/poço. Após 48 h, as células foram expostas durante 24 h às diferentes concentrações de PE, PA-nylon 12 e PVC. Para cada concentração foram realizadas 5 réplicas nos 3 testes independentes (N=3) executados.

### Testes de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada com recurso ao kit CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies). Este kit permite determinar o número de células viáveis em proliferação. Para isto, utiliza um sal de tetrazólio, altamente solúvel em água, o WST-8 ([2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfófenil)-2H-tetrazólio), que produz um corante solúvel em água (formazan), após a sua redução. O WST-8 é reduzido pelas desidrogenases presentes nas células e dá origem a um produto laranja, capaz de se dissolver no meio de cultura. Após a exposição às soluções de PE, PA-nylon 12 e PVC, o meio de cultura foi removido e 5 µL da solução de CCK-8 juntamente com 95 µL de meio de cultura foi adicionado a cada poço. De seguida, as placas com as 3 linhas celulares (Caco-2, HepG2 e N27) foram colocadas durante 2h na incubadora com 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C, protegidas com papel de alumínio devido à fotossensibilidade do WST-8. Depois, foi medida a absorvância a 450 nm num espectrofotómetro de microplacas (xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, BIO-RAD) e, por fim, a viabilidade celular calculada com base na absorvância relativa por comparação com o grupo controlo (células não expostas a MPs).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Citotoxicidade dos MPs em Caco-2

A linha celular Caco-2 é um modelo bem estabelecido para estudar a barreira epitelial intestinal, sendo amplamente utilizada para a avaliação toxicológica de vários compostos (Neves, Figueiredo et al. 2019). O efeito dos microplásticos polietileno (PE), poliamida (PA-nylon 12) e policloreto de vinilo (PVC) na viabilidade das células Caco-2 encontra-se representado na Figura 3. Não se registaram diferenças significativas na viabilidade celular para nenhum microplástico (PE, PA-nylon 12 e PVC) em cada uma das concentrações testadas. Ainda assim, é possível verificar que a concentração mais elevada (4000 mg.L<sup>-1</sup>)



provocou uma redução na viabilidade celular de cerca de 25% tanto para o PE como para o PVC. No caso da PA-nylon 12, a viabilidade celular mantém-se, em todas as concentrações testadas, próxima dos 90%.

Estes resultados estão de acordo com estudo anteriores que demonstraram que a exposição a PA-nylon 12 e PVC não reduz significativamente a viabilidade celular para a mesma gama de concentrações. Relativamente ao PE, observa-se uma ligeira redução na viabilidade celular para a concentração de 4000 mg.L<sup>-1</sup> (p= 0,0410) Esta redução pode estar relacionado com o facto dos autores desse trabalho utilizarem um sistema de cultura invertido e devido a uma abundância excessiva de partículas de PE e PVC no meio extracelular (Stock, Laurisch et al. 2021). Em relação à PA-nylon 12, não existem estudos para esta linha celular pelo que não é possível estabelecer nenhuma comparação.

### Citotoxicidade dos MPs em HepG2

A linha celular HepG2 é um modelo bem estabelecido de hepatócitos para estudos toxicológicos (Ramirez, Strigun et al. 2018). O efeito dos microplásticos polietileno (PE), poliamida (PA-nylon 12) e policloreto de vinilo (PVC) na viabilidade das células HepG2 encontra-se representado na Figura 4.

De uma forma geral, o PE não apresenta reduções significativas na viabilidade celular, mas, por outro lado, a PA-nylon 12 e o PVC registaram uma redução significativa para todas as concentrações testadas e para 0,1; 10;100 e 1000 mg.L<sup>-1</sup>, respetivamente.

Contrariamente ao encontrado na literatura, o PE não apresentou toxicidade para esta linha celular para nenhuma das concentrações testadas. Estes resultados podem estar relacionados com o facto de os autores terem usado um sistema de cultura de células invertido,

permitindo uma exposição mais eficiente ao PE cuja densidade é de 0,94 g.mL<sup>-1</sup>. Num sistema normal, após o tratamento, as partículas de PE ficam à superfície enquanto as células estão no fundo, ao contrário do que acontece com a PA-nylon 12 (1,02 g.mL<sup>-1</sup>) e o PVC (1,40 g.mL<sup>-1</sup>) (Stock, Laurisch et al. 2021). A PA-nylon 12 registou reduções significativas na viabilidade celular para todas as concentrações testadas, contrariamente ao reportado na literatura. A exposição ao PVC também provocou uma diminuição na viabilidade celular, nomeadamente para as concentrações de 0,1; 10; 100 e 1000 mg.L<sup>-1</sup>.

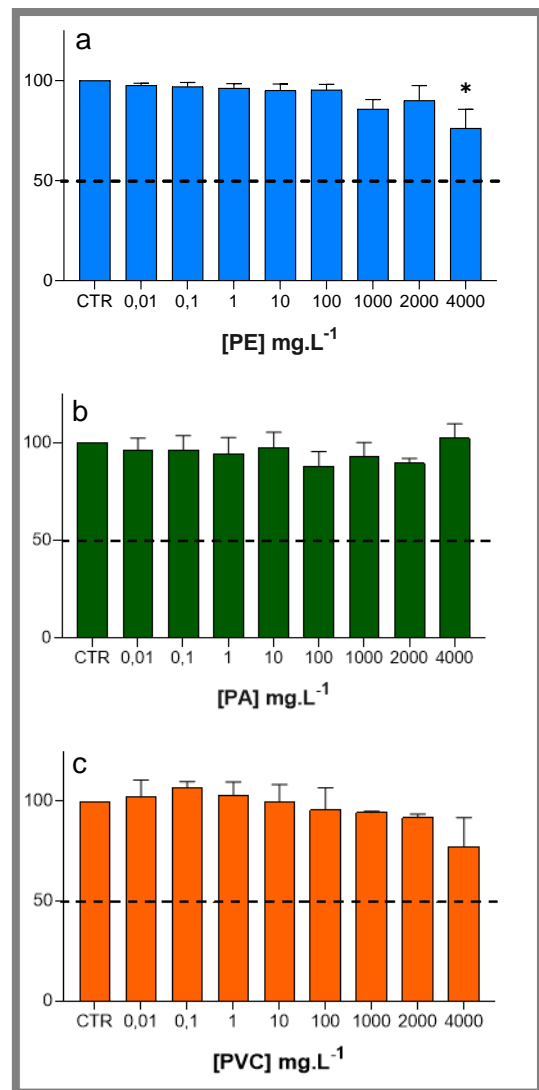


FIGURA 3: Viabilidade após 24 h de exposição a (a) polietileno (PE), (b) poliamida (PA-nylon 12) e (c) policloreto de vinilo (PVC) da linha celular Caco-2. Os valores apresentados dizem respeito à % de células viáveis, normalizadas ao controlo (células não expostas a MPs), para 5 réplicas de 3 testes independentes (n=3), com as respetivas barras de erro. O eixo primário representa as concentrações dos diferentes MPs (mg.L<sup>-1</sup>) às quais as células foram expostas durante 24h. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* (p<0,05).

### Citotoxicidade dos MPs em N27

A linha celular N27 é um modelo de células de neurónios dopaminérgicos usado em vários estudos de doenças neurodegenerativas (Heusinkveld and Westerink 2017). O efeito dos microplásticos polietileno (PE), poliamida (PA-nylon 12) e policloreto de vinilo (PVC) na viabilidade das células N27 encontra-se descrita na Figura 5. De uma forma geral, os neurónios dopaminérgicos são mais sensíveis do que as células epiteliais do intestino e do que os hepatócitos.

No caso do PE, registou-se uma redução significativa da viabilidade celular para a concentração de 2000 mg.L<sup>-1</sup> e altamente significativa na concentração de 4000 mg.L<sup>-1</sup>. Para a PA-nylon 12, não se registou qualquer diferença significativa. Para o PVC, a exposição a 4000 mg.L<sup>-1</sup> causou uma redução muito significativa na viabilidade celular. Uma vez que não existem estudos com MPs em N27, a comparação com a literatura não é possível.

Apesar dos efeitos dos microplásticos em humanos não serem, até ao momento, claros, é especulado que partículas de tamanho superior a 150 µm não sejam absorvidas pelo organismo. No entanto, quando tamanho é inferior a 150 µm, há possibilidade de passarem da cavidade intestinal para o sistema linfático e circulatório (Barboza, Dick Vethaak et al. 2018). Contudo, é especulado que apenas 0,3% dessas partículas sejam absorvidas, além de que apenas 0,1% das partículas com tamanho superior a 10 µm poderá ser capaz de chegar a outros órgãos, membranas e passar a barreira hematoencefálica e a placenta (Barboza, Dick Vethaak et al. 2018). De facto, a maioria dos MPS que chegam a trato gastrointestinal é eliminada através das fezes. Na verdade, o sistema excretor pode ser responsável por remover até 90% dos microplásticos e nanoplásticos que são ingeridos (Smith, Love et al. 2018). Estudos recentes demonstraram a presença de MPs em fezes humanas maioritariamente PE e PP (polipropileno) (Zhang et al. 2021) com um tamanho compreendido entre 5 e 500 µm (Harvey and Watts 2018, Schwabl, Köppel et al. 2019).

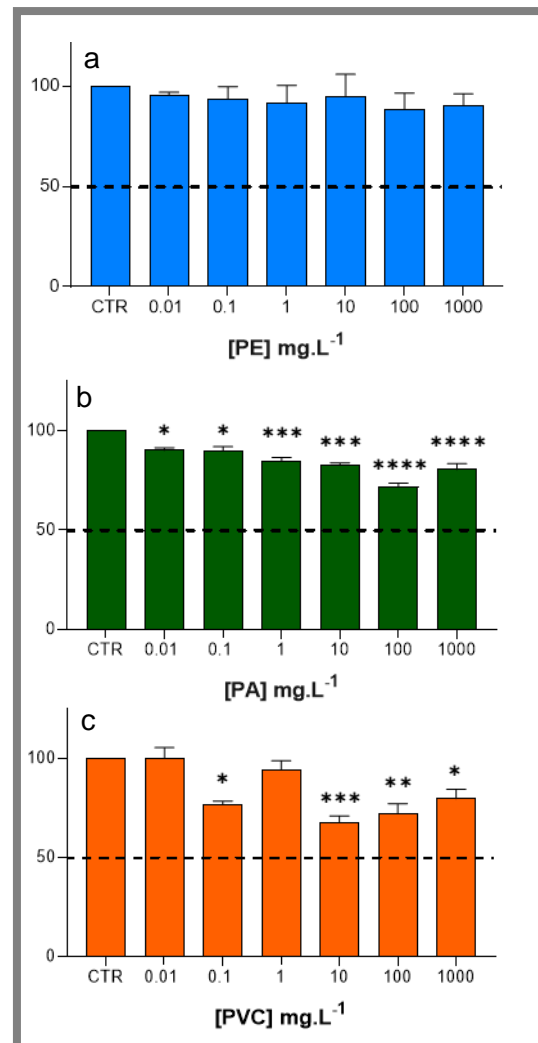


FIGURA 4: Viabilidade após 24h de exposição a (a) polietileno (PE), (b) poliamida (PA-nylon 12) e (c) policloreto de vinilo (PVC) da linha celular HepG2. Os valores apresentados dizem respeito à % de células viáveis, normalizadas ao controlo (células não expostas a MPs), para 5 réplicas de 3 testes independentes (n=3), com as respetivas barras de erro. O eixo primário representa as concentrações dos diferentes MPs (mg.L<sup>-1</sup>) às quais as células foram expostas durante 24h. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* (p<0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) e \*\*\*\* (p<0,0001).



Estudos anteriores em ratinhos, referem que a distribuição dos microplásticos nos tecidos, em parte, é determinada pelo tamanho de partícula, sendo detetadas consistentemente acumulações de partículas de 20 µm de diâmetro em vários tecidos ao longo do corpo, enquanto que partículas de 5 µm de diâmetro permanecem no intestino (Deng, Zhang et al. 2017).

As partículas testadas no presente trabalho são maioritariamente <50 µm, pelo que é expectável que num organismo vivo consigam entrar na corrente sanguínea.



### CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste trabalho avaliou-se a citotoxicidade de microplásticos comuns (PE, PA-nylon 12 e PVC em 3 linhas celulares distintas: Caco-2, HepG2 e N27. Para a linha celular do intestino (Caco-2) apenas o PE, induziu diminuições significativas da viabilidade celular, com uma redução <25% na viabilidade das células quando expostas à maior concentração (4000 mg.L<sup>-1</sup>). Para a linha celular hepática (HepG2) apenas o PE não induziu citotoxicidade, tendo a maior redução da viabilidade celular sido registada para o PVC. Para as células neuronais (N27) todos os microplásticos induziram efeitos significativos com o PE a ser o mais citotóxico. Uma vez que no presente trabalho se usaram apenas MPs puros e isoladamente e considerando que no ambiente real os organismos, incluindo humanos, estão simultaneamente expostos a múltiplos MPs, a MPs que já adsorveram contaminantes ambientais, e a misturas de outros compostos, no futuro devem realizar-se experiência em cenários mais realistas utilizando misturas de MPs, aditivos e contaminantes.

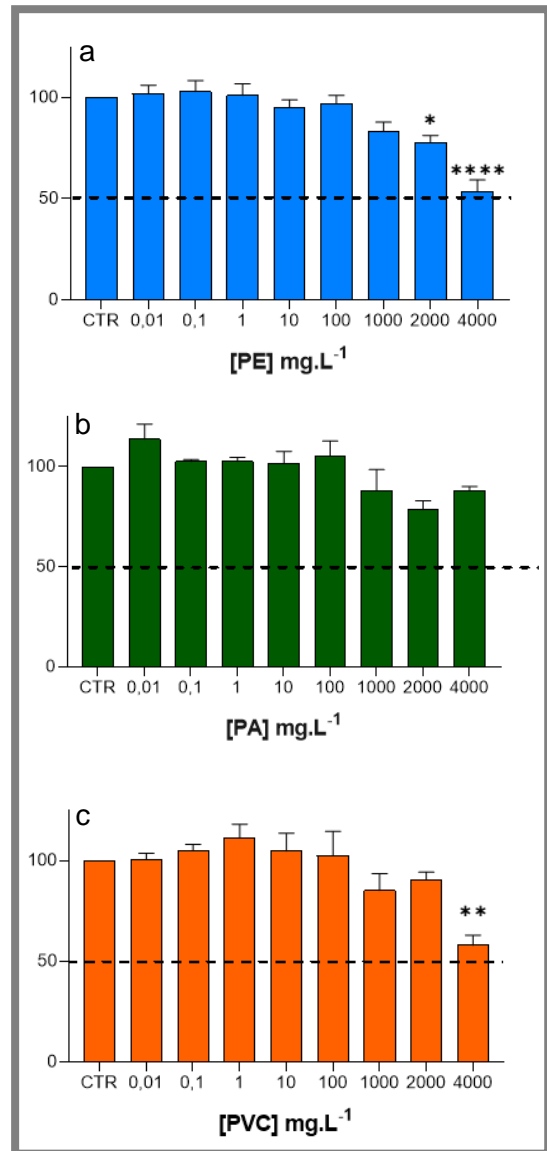


FIGURA 5: Viabilidade celular após 24 h de exposição a (a) polietileno (PE), (b) poliamida (PA-nylon 12) e (c) policloreto de vinilo (PVC) da linha celular N27. Os valores apresentados dizem respeito à % de células viáveis, normalizadas ao controlo (células não expostas a MPs), para 5 réplicas de 3 testes independentes (n=3), com as respetivas barras de erro. O eixo primário representa as concentrações dos diferentes MPs (mg.L<sup>-1</sup>) às quais as células foram expostas durante 24h. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* (p<0,05), \*\* (p>0,01), \*\*\*\* (p<0,0001).

**agradecimentos** • Este trabalho foi suportado por verbas do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI) financiado por Fundos Nacionais pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (UID/Multi/00709/2019) e pelo projeto ICON "Interdisciplinary Challenges on Neurodegeneration (ICON)" (Ref. CENTRO-01-0145-FEDER-000013). Apoio financeiro adicional foi fornecido pelo CICECO-Aveiro Institute of Materials, FCT Ref. UIDB/50011/2020 & UIDP/50011/2020, pelo CHRC - Comprehensive Health Research Centre (UIDP/04923/2020) e pelo projeto tesseRESPIRA fundado pela Labex DRIIHM (PIA), Observatório Internacional Hommes-Millieux, ferramenta do CNRS/INEE-Centro Nacional de Pesquisa Científica/Instituto de Ecologia e Meio Ambiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anbumani, S. and P. Kakkar (2018). "Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review." *Environmental Science and Pollution Research* 25(15): 14373-14396.
- Arthur, C., J. E. Baker and H. A. Bamford (2009). "Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris, September 9-11, 2008, University of Washington Tacoma, Tacoma, WA, USA."
- Barboza, L. G. A., A. Dick Vethaak, B. R. B. O. Lavorante, A.-K. Lundebye and L. Guilhermino (2018). "Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health." *Marine Pollution Bulletin* 133: 336-348.
- Barboza, L. G. A., A. Dick Vethaak, B. R. B. O. Lavorante, A. K. Lundebye and L. Guilhermino (2018). "Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health." *Marine Pollution Bulletin* 133: 336-348.
- Catarino, A. I., V. Macchia, W. G. Sanderson, R. C. Thompson and T. B. Henry (2018). "Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibres fallout during a meal." *Environmental Pollution* 237: 675-684.
- Costa, M. F., J. Pinto da Costa and A. C. Duarte (2018). "Sampling of micro(nano)plastics in environmental compartments: How to define standard procedures?" *Current Opinion in Environmental Science & Health* 1: 36-40.
- da Costa, J. P., A. C. Duarte and T. A. P. Rocha-Santos (2017). Characterization and Analysis of Microplastics. *Comprehensive Analytical Chemistry*. T. A. P. Rocha-Santos and A. C. Duarte, Elsevier. 75: i.
- da Costa, J. P., P. S. M. Santos, A. C. Duarte and T. Rocha-Santos (2016). "(Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects." *Sci Total Environ* 566-567: 15-26.
- Deng, Y., Y. Zhang, B. Lemos and H. Ren (2017). "Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure." *Scientific Reports* 7(1): 46687.
- Dris, R. G., J.: Rocher, V.: Saad, M.: Renault, N.: Tassin, B. (2015). "Microplastic contamination in an urban area: A case study in Greater Paris." *Environmental Chemistry* 12(5): 592-599.
- Espinosa, C., J. M. Garcia Beltran, M. A. Esteban and A. Cuesta (2018). "In vitro effects of virgin microplastics on fish head-kidney leucocyte activities." *Environ Pollut* 235: 30-38.
- European Parliament (2019). "Microplastics: sources, effects and solutions."
- Galloway, T. S. (2015). Micro- and Nano-plastics and Human Health. *Marine Anthropogenic Litter*. M. Bergmann, L. Gutow and M. Klages. Cham, Springer International Publishing: 343-366.
- Hale, R. C. (2017). "Analytical challenges associated with the determination of microplastics in the environment." *Analytical Methods* 9(9): 1326-1327.
- Hamilton, L. A., S. Feit, C. Muffett, M. Kelso, S. M. Rubright, C. Bernhardt, E. Schaeffer, D. Moon, J. Morris and R. Labbé-Bellas (2019). "Plastic & Climate - The Hidden Costs of a Plastic Plane." *Center for International Environmental Law*
- Harvey, F. and J. Watts. (2018). "Microplastics Found in Human Stools for the First Time." from <https://www.theguardian.com/environment/2018/oct/22/microplastics-found-in-human-stools-for-the-first-time>.
- Hernandez, L. M., N. Yousefi and N. Tufenkji (2017). "Are There Nanoplastics in Your Personal Care Products?" *Environmental Science & Technology Letters* 4(7): 280-285.
- Heusinkveld, H. J. and R. H. S. Westerink (2017). "Comparison of different in vitro cell models for the assessment of pesticide-induced dopaminergic neurotoxicity." *Toxicology in Vitro* 45: 81-88.
- Koehler, A., A. Anderson, A. Andrady, C. Arthur, J. Baker, H. Bouwman, S. Gall, V. Hidalgo-Ruz, A. Koehler, K. Law, H. Leslie, P. Kershaw, S. Pahl, J. Potemra, P. Ryan, W. Shim, R. Thompson, H. Takada, A. Turra and K. Wyles (2015). Sources, Fate and Effects of Microplastics in the Marine Environment: A Global Assessment.

- Lu, L., T. Luo, Y. Zhao, C. Cai, Z. Fu and Y. Jin (2019). "Interaction between microplastics and microorganism as well as gut microbiota: A consideration on environmental animal and human health." *Science of The Total Environment* 667: 94-100.
- Lusher, A. L., N. A. Welden, P. Sobral and M. Cole (2017). "Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates." *Analytical Methods* 9(9): 1346-1360.
- Neves, C. M. S. S., M. Figueiredo, P. M. Reis, A. C. A. Sousa, A. C. Cristóvão, M. B. Fiadeiro, L. P. N. Rebelo, J. A. P. Coutinho, J. M. S. S. Esperança and M. G. Freire (2019). "Simultaneous Separation of Antioxidants and Carbohydrates From Food Wastes Using Aqueous Biphasic Systems Formed by Cholinium-Derived Ionic Liquids." *Frontiers in Chemistry* 7(459).
- Ogonowski, M., Z. Gerdes and E. Gorokhova (2018). "What we know and what we think we know about microplastic effects – A critical perspective." *Current Opinion in Environmental Science & Health* 1: 41-46.
- Oliveira, M., M. Almeida and I. Miguel (2019). "A micro(nano)plastic boomerang tale: A never ending story?" *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 112: 196-200.
- Pinto da Costa, J., T. Rocha-Santos and A. C. Duarte (2020). "The environmental impacts of plastics and micro-plastics use, waste and pollution: EU and national measures." *European Parliament's Committee on Petitions*.
- PlasticsEurope (2019). "Plastics - the facts 2019."
- PlasticsEurope (2020). "Plastics – the Facts 2020."
- Prata, J. C., J. P. da Costa, I. Lopes, A. C. Duarte and T. Rocha-Santos (2020). "Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects." *Science of The Total Environment* 702: 134455.
- Ramirez, T., A. Strigun, A. Verlohner, H.-A. Huener, E. Peter, M. Herold, N. Bordag, W. Mellert, T. Walk, M. Spitzer, X. Jiang, S. Sperber, T. Hofmann, T. Hartung, H. Kamp and B. van Ravenzwaay (2018). "Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells." *Archives of Toxicology* 92(2): 893-906.
- Revel, M., A. Châtel and C. Mouneyrac (2018). "Micro(nano)plastics: A threat to human health?" *Current Opinion in Environmental Science & Health* 1: 17-23.
- Rochman, C. M., C. Brookson, J. Bikker, N. Djuric, A. Earn, K. Bucci, S. Athey, A. Huntington, H. McIlwraith, K. Munno, H. De Frond, A. Kolomijeca, L. Erdle, J. Grbic, M. Bayoumi, S. B. Borrelle, T. Wu, S. Santoro, L. M. Werbowski, X. Zhu, R. K. Giles, B. M. Hamilton, C. Thaysen, A. Kaura, N. Klasios, L. Ead, J. Kim, C. Sherlock, A. Ho and C. Hung (2019). "Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite." *Environmental Toxicology and Chemistry* 38(4): 703-711.
- Salim, S. Y., G. G. Kaplan and K. L. Madsen (2014). "Air pollution effects on the gut microbiota." *Gut Microbes* 5(2): 215-219.
- Schwabl, P., S. Köppel, P. Königshofer, T. Bucsics, M. Trauner, T. Reiberger and B. Liebmann (2019). "Detection of Various Microplastics in Human Stool: A Prospective Case Series." *Ann Intern Med* 171(7): 453-457.
- Schwaferts, C., R. Niessner, M. Elsner and N. P. Ivleva (2019). "Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 112: 52-65.
- Smith, M., D. C. Love, C. M. Rochman and R. A. Neff (2018). "Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health." *Current environmental health reports* 5(3): 375-386.
- Stock, V., C. Laurisch, J. Franke, M. H. Dönmez, L. Voss, L. Böhmert, A. Braeuning and H. Sieg (2021). "Uptake and cellular effects of PE, PP, PET and PVC microplastic particles." *Toxicology in Vitro* 70: 105021.
- Van Cauwenberghe, L. and C. R. Janssen (2014). "Microplastics in bivalves cultured for human consumption." *Environmental Pollution* 193: 65-70.
- Vianello, A., R. L. Jensen, L. Liu and J. Vollertsen (2019). "Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a Breathing Thermal Manikin." *Scientific Reports* 9(1): 8670.