

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BIANCA CAROLINE MIARA OSATCHUK

AVALIAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS PRESENTES EM CONCENTRADOS DE  
PLAQUETAS

PONTA GROSSA

2022

BIANCA CAROLINE MIARA OSATCHUK

AVALIAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS PRESENTES EM CONCENTRADOS DE  
PLAQUETAS

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

PONTA GROSSA

2022

O81 Osatchuk, Bianca Caroline Miara  
Avaliação de microplásticos presentes em concentrados de plaquetas /  
Bianca Caroline Miara Osatchuk. Ponta Grossa, 2022.  
58 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração:  
Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade  
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

1. Microplásticos. 2. Hemocomponentes. 3. Raman. 4. FTIR. 5. MEV/EDS. I.  
Favero, Giovani Marino. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos,  
Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615

Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa

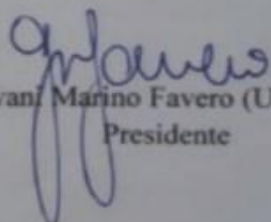
ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 02/2022 DA MESTRANDA **BIANCA CAROLINE MIARA OSATCHUK**, REALIZADA NO DIA 20 DE MAIO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.


Aos vinte dias do mês de maio de dois mil e vinte e dois, às 14h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão aberta, na Sala M 115 (Auditório do PPGCF), sob a presidência do Professor Doutor Giovani Marino Favero, reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda **BIANCA CAROLINE MIARA OSATCHUK**, na linha de pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelo Professor Doutor Giovani Marino Favero (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): Juliana Berton (UNICESUMAR/PR) e Susete Wambier Christo (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: "AVALIAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS PRESENTES EM CONCENTRADOS DE PLAQUETAS". Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a Dissertação, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

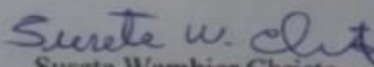
Observações (se necessário): \_\_\_\_\_

Alteração de título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

  
Giovani Marino Favero (UEPG/PR)  
Presidente

  
Juliana Berton  
(Unicesumar/PR) Titular

  
Susete Wambier Christo  
(UEPG/PR) Titular

Ponta Grossa, 20 de maio de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me guiar até aqui.

Ao Prof.Dr. Giovani Marino Favero, pela orientação e contribuição de seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

Ao Profa.Dra Susete Wambier Christo pela contribuição de seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

Ao Gabriel Staichak, pela contribuição de seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

Ao Augusto Ferreira Jr., pela contribuição de seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Airton Vicente Pereira por sua contribuição nessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame pela orientação e paciência.

Ao Prof.Dr. Fábio André dos Santos pela contribuição nessa pesquisa e por ter uma paciência inacreditável para ensinar.

Aos professores Msc. Celso e Msc. Cintia por serem exemplos de profissionais na carreira acadêmica e seres humanos maravilhosos.

Aos funcionários do C-labmu (Vanessa, Sílvio e Cristiane) pela contribuição direta nessa pesquisa.

Ao meu marido, por acreditar no meu potencial.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão dessa pesquisa.

## RESUMO

Resíduos, fragmentos ou finos filmes plásticos que apresentam um diâmetro maior que 0,1  $\mu$  e menor que 5 mm são denominados microplásticos e são derivados, mais comumente, dos seguintes materiais: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e poliéster (PES). Os microplásticos podem ser classificados em duas categorias. Os microplásticos primários são produzidos para serem utilizados em produtos industriais e acabam lançados nos oceanos por meio de rios e estações de tratamento de esgoto, já os secundários são pequenos fragmentos de resíduos plásticos formados gradativamente através dos grandes fragmentos presentes no meio ambiente. Como os microplásticos estão presentes no meio ambiente e em alguns produtos de consumo humano, torna-se irremediável a exposição do homem a essas partículas. Existem ainda poucas pesquisas avaliando os danos causados à saúde humana pela exposição ao microplásticos, assim como pouco se sabe sobre as fontes de exposição. Esse trabalho teve por objetivo avaliar a presença de microplásticos em bolsas de concentrados plaquetários. Foi realizada a caracterização química do material da bolsa, responsável por armazenar em seu interior o concentrado de plaquetas com o objetivo de comparar o resultado obtido com o das fibras encontradas no concentrado. A análise de Raman foi realizada para obter uma identidade química das amostras, assim como foram utilizadas metodologias de triagem para buscar estruturas que apresentassem características físicas e visuais de materiais plásticos. Foram encontradas 26 potenciais fibras de microplásticos no total, as quais não demonstraram ter correlação com a quantidade de volume presente nas bolsas. As fibras foram analisadas através da técnica de Raman e obtiveram – se espectros compatíveis com fibras de *cotton* e celulose em sua maioria. Fibras de materiais poliméricos foram encontradas em pequena quantidade e com baixa compatibilidade aos espectros de referência presentes na biblioteca do software *Spectragryph - optical spectroscopy*. As análises de microscopia eletrônica de varredura com EDS/SEM identificaram elementos como carbono e oxigênio, principais constituintes de materiais poliméricos. Pode - se concluir, com base nas metodologias óptica e MEV/EDS, que as fibras encontradas são altamente sugestivas de serem de microplásticos, porém não foi possível identificar a origem dessas fibras. São necessárias alterações na metodologia e processamento das amostras a afim de obter melhores resultados na metodologia do Raman e assim garantir a identidade química dos materiais.

**Palavras chave:** Microplásticos, Hemocomponentes, EDS/SEM, Raman, FTIR.

## ABSTRACT

Residuum, fragments or thin plastic films that have a diameter greater than 0.1  $\mu$  and less than 5 mm are called microplastics and are most commonly derived from the following materials: polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS) and polyester (PES). Microplastics can be classified into two categories. Primary microplastics are produced to be used in industrial products and end up released into the oceans through rivers and sewage treatment plants, whereas secondary plastics are small fragments of plastic waste that are gradually formed through the large fragments present in the environment. As microplastics are present in the environment and in some products for human consumption, human exposure to these particles becomes irremediable. There are still few studies evaluating the damage caused to human health by exposure to microplastics, as well as little is known about the sources of exposure. This study aimed to evaluate the presence of microplastics in bags of platelet concentrates, categorizing or not as a possible source of exposure to these particles. Chemical characterization of the material of the bag, responsible for storing the platelet concentrate inside, was carried out in order to compare the result obtained with the fibers found in the concentrate result. Raman analysis was performed to obtain a chemical identity of the samples, as well as screening methodologies were used to look for structures that presented physical and visual characteristics of plastic materials. A total of 26 potential microplastic fibers were found, which showed no correlation with the amount of volume present in the bags. The fibers were analyzed using the Raman technique and spectra were obtained compatible with most cotton and cellulose fibers. Fibers of polymeric materials were found in small quantity and with low compatibility to the reference spectra present in the Spectragryph software library - optical spectroscopy. Scanning electron microscopy analysis with EDS/SEM identified elements such as carbon and oxygen, main constituents of polymeric materials. Based on optical and SEM/EDS methodologies, it can be concluded that the fibers found are highly suggestive of being microplastics, but it was not possible to identify the origin of these fibers. Changes in the methodology and processing of the samples are necessary in order to obtain better results in the Raman methodology and thus guarantee the chemical identity of the materials.

**Keywords:** Microplastics, Blood components, EDS/SEM, Raman, FTIR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bolsa de concentrado de plaquetas .....	31
Figura 2 - Amostras com adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	33
Figura 3 - Fibra visualizada através de microscopia óptica na amostra 2A. ....	39
Figura 4 - Teste de Shaapiro Wilk .....	39
Figura 5 - Teste de correlação de Pearson (valores) .....	40
Figura 6 - Teste de correlação de Pearson (gráfico) .....	40
Figura 7 - Espectro obtido do fragmento plástico da bolsa.....	41
Figura 8 - Resultado de compatibilidade do espectro com a biblioteca.....	42
Figura 9 - Fibra danificada pela ação do laser do Raman. ....	44
Figura 10 - Espectro obtido da análise de fragmento da bolsa de PVC. ....	44
Figura 11 - Resultado de compatibilidade do espectro FTIR encontrado.....	45
Figura 12 - Resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos da bolsa.....	46
Figura 13 - Microscopia óptica e microscopia eletrônica com EDS da amostra 1. ....	47
Figura 14 - Microscopia óptica e microscopia eletrônica com EDS da amostra 2. ....	47



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	11
2.1	OBJETIVO GERAL .....	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
3.1	DESENVOLVIMENTO DO MICROPLÁSTICO .....	12
3.2	ROTAS DE EXPOSIÇÃO AOS MICROPLÁSTICOS .....	13
3.2.1	Ingestão .....	13
3.2.2	Inalação .....	15
3.2.3	Contato com a pele .....	17
3.2.4	Toxicidade e estresse oxidativo .....	18
3.2.5	Corrente sanguínea e tecidos .....	19
3.2.6	Vetores de microrganismos e produtos químicos potencialmente tóxicos .....	21
3.3	CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS .....	22
3.4	BOLSAS DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1	AMOSTRAS .....	30
4.2	CONTROLE DE QUALIDADE E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	31
4.3	FILTRAÇÃO E DIGESTÃO DAS AMOSTRAS .....	32
4.4	MICROSCOPIA ÓPTICA .....	35
4.5	RAMAN .....	35
4.6	FTIR .....	36
4.7	MEV/ EDS .....	37
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38

5.1	MICROSCOPIA ÓPTICA.....	38
5.2	RAMAN .....	41
5.3	FTIR .....	44
5.4	MEV/EDS .....	45
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Resíduos, fragmentos ou finos filmes plásticos que apresentam um diâmetro maior que  $0,1 \mu$  e menor que 5 mm são denominados microplásticos e são derivados, mais comumente, dos seguintes materiais: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e poliéster (PES). Os microplásticos surgem da degradação, intencional ou relacionada a fatores ambientais, de materiais plásticos e podem ser classificados em duas categorias (ÇOBANOĞLU *et al.*, 2021; LI, Boqing *et al.*, 2020).

Os microplásticos primários são produzidos para serem utilizados em produtos industriais e acabam lançados nos oceanos por meio de rios e estações de tratamento de esgoto, já os secundários são pequenos fragmentos de resíduo plásticos formados gradativamente através dos grandes fragmentos presentes no meio ambiente (LI, Boqing *et al.*, 2020; PRATA *et al.*, 2020).

Devido à grande quantidade de plásticos produzidos em todas as áreas de setores de materiais (embalagem, construção e transporte), a contaminação do meio ambiente com plásticos e microplásticos está se tornando cada vez mais aparente, visto que, relatos da presença de resíduos plásticos em oceanos, lagos, rios e até mesmo em animais aquáticos e terrestres, devido a sua ingestão, começaram a surgir já a partir da década de 70 (DÜMICHEN *et al.*, 2017; SHARMA; CHATTERJEE, 2017). Apesar disso, o termo microplásticos somente foi usado pela primeira vez no ano de 2004 para se referir o acúmulo de fragmentos plásticos que com o transcorrer do tempo, passam a apresentar apenas alguns microns de diâmetro (NAPPER; THOMPSON, 2020).

Como os microplásticos estão presentes no meio ambiente e em alguns produtos de consumo humano, torna - se irremediável a exposição do homem a essas partículas. Entretanto, as consequências e a parcela de exposição humana aos microplásticos ainda não estão bem consolidadas, embora existam estimativas dessa exposição através de rotas de ingestão e inalação. Muitos estudos relacionam a migração e distribuição de microplásticos no meio ambiente, assim como seus efeitos nocivos ao organismos marinhos, porém faltam pesquisas sobre os riscos para a saúde humana (LI, Boqing *et al.*, 2020; PRATA *et al.*, 2020).

Para a determinação dos efeitos de exposição a saúde humana são realizados muitos estudos em modelos animais, como camundongos ou ratos, ou até mesmo em culturas de células (LIM *et al.*, 2021; PRATA *et al.*, 2020).

A adaptação de procedimentos usuais de diagnóstico pode auxiliar a obter uma maior precisão na determinação da exposição aos microplásticos. Amostras de tecido obtidas de biópsias e autópsias podem auxiliar na determinação histológica, no entanto, os métodos de identificação nessas amostras ainda necessitam de aprimoramento e são limitados pela disponibilidade de tecidos, assim como o risco de contaminação das amostras com utensílios plásticos utilizados na medicina (PRATA *et al.*, 2020).

Amostras biológicas são consideradas como uma alternativa e já vem sendo utilizadas em estudos. Por exemplo, Schwabl *et al.* (2019) utilizaram amostras de fezes para obter informações a respeito da exposição a microplásticos no sistema gastrointestinal.

Nesse presente estudo utilizamos amostras de bolsas de concentrados de plaquetas, um hemocomponente obtido através da centrifugação de sangue total, afim de obter uma projeção da exposição humana aos microplásticos após o processo de transfusão plaquetária. Seja por meio do sangue do doador, contendo microplásticos, para o receptor, ou ainda proveniente da degradação do próprio material plástico que constitui a bolsa e entra em contato com essa amostra biológica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Verificar se há estruturas compatíveis com microplásticos em concentrados de plaquetas;

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Fazer a caracterização visual e química do polímero que compõe a bolsa utilizada para armazenar os concentrados plaquetários e das estruturas compatíveis com microplásticos encontradas na suspensão em seu interior;
- Validar a identidade química dos materiais encontrados através de metodologias de espectroscopia;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 DESENVOLVIMENTO DO MICROPLÁSTICO

Plásticos são polímeros sintéticos ou semissintéticos, compostos também de outros aditivos em sua estrutura como estabilizadores térmicos, agentes antimicrobianos e corantes, que são utilizados para melhorar sua aparência e desempenho. São derivados de fontes petroquímicas ou sintetizados de combustíveis fósseis e até mesmo de biomassa. Esses polímeros têm uma estrutura molecular de cadeias longas formadas por repetidas unidades estruturais químicas de hidrocarbonetos (NAPPER; THOMPSON, 2020).

Devido a sua facilidade de fabricação, baixo custo, alta resistência e durabilidade o plástico começou a ser amplamente utilizado pela sociedade através dos anos, o que resultou em maior produção desse material e também aumento de resíduos provenientes dele, conseqüentemente (SHARMA; CHATTERJEE, 2017). Cerca de 39,5% dos detritos plásticos são provenientes de embalagens; 20,1% de materiais de construção; 10% de artes de pesca; 8,6% de peças automotivas; 5,7% de utilidades eletrônicas e 3,4% são componentes da agroindústria. Em proporções menores encontram-se os resíduos de origem doméstica, hospitalar e equipamentos esportivos (KIRAN; KOPPERI; MOHAN, 2022).

Visto que muitos dos utensílios plásticos usados no dia a dia são descartáveis e demasiadamente resistentes à degradação, leva-se um longo tempo até que suas quebras e decomposições sejam efetivas. Além disso, o descarte inadequado desses materiais, em lixo comum, resulta em sua deposição em aterros sanitários, no meio ambiente e até em ambientes aquáticos (SHARMA; CHATTERJEE, 2017).

Uma vez que se encontram depositados no meio ambiente, os materiais plásticos sofrem processos de degradação, como mineralização (gerando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e produtos químicos inorgânicos), ação de mecanismos físicos, luz ultravioleta (UV), ação mecânica (desgaste por atrito, ação das ondas e agitação em ambiente marinho), ação térmica e química. Os processos de degradação, embora bastante demorados, fazem com o que os plásticos percam sua rigidez estrutural, e resultem em fragmentos, em pó e pedaços de tamanho microscópicos (ÇOBANOĞLU *et al.*, 2021; LI, Boqing *et al.*, 2020).

Embora o desenvolvimento dos microplásticos esteja muito atrelado ao uso de materiais plásticos e do seu descarte, com exceção dos microplásticos produzidos

para serem utilizados em produtos de beleza e higiene, a manipulação de materiais plásticos no dia a dia também pode gerar microplásticos, por exemplo, roupas sintéticas liberam microplásticos ao serem submetidas a estresses mecânicos e químicos durante o processo de lavagem na máquina de lavar roupa, uma vez que esses processos levam ao desprendimento das microfibras dos fios que constituem o têxtil (FALCO *et al.*, 2019). As mamadeiras de polipropileno, amplamente utilizadas para a preparação de fórmulas infantis, também apresentam liberação de microplásticos ao serem submetidas aos procedimentos padrões de esterilização para limpeza, e aquecimento e agitação durante o preparo da fórmula, conforme avaliado por LI, D. *et al.* (2020) em seu estudo. Isso ocorre porque os plásticos são materiais termicamente sensíveis e o uso repetido de condições de alta temperatura pode acelerar a degradação e a liberação de microplásticos, assim como a força de atrito mecânico que pode quebrar o propileno em pequenas partículas.

Devido ao alto consumo de materiais plásticos pela sociedade cada vez mais microplásticos são gerados, e uma vez que sejam originados, por conta do seu tamanho, podem se deslocar com facilidade para diferentes lugares, portanto, é inevitável exposição humana a essas partículas. Embora as consequências desta exposição ainda não sejam bem compreendidas, existam algumas hipóteses de rotas de exposição e mecanismos de toxicidade (PRATA *et al.*, 2020).

## 3.2 ROTAS DE EXPOSIÇÃO AOS MICROPLÁSTICOS

Sugere-se que corpo humano é exposto através da ingestão de alimentos que contenham microplásticos, inalação dessas partículas presentes no ar e o contato da pele com as mesmas, que estão contidas em produtos dermatológicos, tecidos e poeira. A exposição é facilitada devido o tamanho dessas pequenas partículas e pode causar danos à saúde (LI, Boqing *et al.*, 2020; PRATA *et al.*, 2020).

### 3.2.1 Ingestão

A ingestão de microplásticos pode ocorrer, eventualmente, através do seu acúmulo em alguns organismos marinhos como: ostras, mexilhões, pepinos do mar, caranguejos e peixes, os quais carregam o material através da cadeia alimentar até

chegar ao ser humano, ou através da ingestão de sal marinho. Outro mecanismo de exposição seria a ingestão inconsciente de microplásticos e partículas de microesferas que estejam presentes em pastas de dente e que podem ser engolidos e absorvidos através do trato gastrointestinal (LI, Boqing *et al.*, 2020; PRATA *et al.*, 2020; SHARMA; CHATTERJEE, 2017). Existem relatos também da presença de fragmentos plásticos em águas de garrafa e em açúcar, que são produtos bastante consumidos pela população (RAHMAN *et al.*, 2021).

Então, considerando o fato de que a alimentação humana e o meio ambiente estão contaminados com microplásticos, seria essa considerada a maior e mais altamente provável rota de exposição humana a esses fragmentos (LI, Boqing *et al.*, 2020; PRATA *et al.*, 2020; SHARMA; CHATTERJEE, 2017). Contudo, os riscos de ingestão de microplásticos não são completamente conhecidos pois ainda existem poucas pesquisas referentes à exposição humana e os seus efeitos (PRATA *et al.*, 2020).

Schwabl *et al.* (2019) conduziram um estudo para analisar fezes humanas quanto à presença de microplásticos e determinar se os seres humanos os ingerem involuntariamente. Cada um dos oito voluntários participantes (três homens e cinco mulheres) forneceu uma amostra de fezes. Todas as amostras analisadas continham microplásticos, variando em tamanho de 50 a 500  $\mu\text{m}$ , sendo que partículas de polipropileno e polietileno representaram quase 80% da carga total de microplásticos. Além disso, foram detectados outros 7 tipos de microplástico, sugerindo que as fontes potenciais de ingestão são múltiplas.

Uma vez que sejam ingeridas as partículas plásticas podem penetrar no muco intestinal devido ao seu pequeno tamanho ou com o auxílio de sucos intestinais que aumentam a sua solubilidade (POWELL; THOREE; PELE, 2007). Outro possível mecanismo de penetração seria a transferência das partículas através do epitélio intestinal simples, formado por uma única camada de células, via paracelular, ou seja, transporte entre as junções das células. Caso tenham alta aderência ao muco intestinal, o trabalho de depuração dessas partículas é facilitado com ajuda das células do sistema imunológico presentes no intestino, as células M especializadas, caso contrário pode ocorrer translocação dessas partículas para outros órgãos e tecidos (PRATA *et al.*, 2020).

LI, B. *al.* (2020) avaliaram “*in vivo*” as alterações na microbiota intestinal e os processos inflamatórios relacionados a ingestão de microplásticos derivados de



Polietileno (PE). No presente estudo, quatro grupos de camundongos (n=20 para cada grupo), com exceção do grupo controle, foram alimentados com concentrações de microplásticos em diferentes proporções. Ao final do estudo observou-se que os animais tiveram a diversidade e composição da microflora intestinal alterada após a ingestão dos microplásticos de PE e que essa alteração foi ainda mais significativa no grupo alimentado com a mais alta concentração do plástico. Conclui-se também que diferentes quantidades de microplásticos, quando ingeridas, têm a capacidade de afetar a secreção de citocinas específicas e podem também, inclusive, causar aumento de uma citocina pró inflamatória no soro, a interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ). Além de diminuir a porcentagem de células T auxiliares (TH17) e células T reguladoras, dentre as células CD4+, e induzir um processo inflamatório no intestino através da ativação do *Toll-like receptor 4* (TLR4). Em condições de disbiose, onde ocorre uma alteração na quantidade e na variedade de bactérias que compõem a flora intestinal, gerando desequilíbrio, o sistema imunológico atua de diferentes modos, pois bactérias específicas da microbiota possuem a capacidade de induzir a diferenciação celular desse sistema e também agir na modulação do processo inflamatório.

### 3.2.2 Inalação

Microplásticos são liberados no ar através de inúmeras fontes, através de tecidos sintéticos, abrasão de materiais (por exemplo, pneus de carro) e também da resuspensão dessas partículas no ar (CAMPANALE *et al.*, 2020; PRATA *et al.*, 2020). Os microplásticos transportados pelo ar provêm principalmente de plásticos maiores que sofreram degradação por meio da luz UV e após essa degradação essas partículas puderam ser facilmente sopradas para a atmosfera por correntes de ar devido ao seu pequeno tamanho e baixa densidade (LETT *et al.*, 2021).

A partículas de microplásticos respiráveis são definidas como aquelas que podem alcançar e se depositar na região do pulmão em que se localizam os alvéolos e ocorrem as trocas gasosas. Embora microplásticos muito grandes também possam ser inaláveis, partículas com tamanho superiores a 5  $\mu\text{m}$  têm sua deposição pulmonar diminuída significativamente à medida que são submetidos a depuração mucociliar, uma vez que a depuração protege os pulmões dessas partículas, suspendendo-as no muco, para que então os cílios do endotélio respiratório possam empurrar as partículas para cima e para fora das vias aéreas em direção a faringe, onde a partícula

é deglutida e entra na via de ingestão descrita anteriormente (GASPERI *et al.*, 2018; LETT *et al.*, 2021). O tamanho e a densidade das partículas irão influenciar em sua deposição no sistema respiratório, sendo que as partículas mais leves e menores chegam mais fundo nos pulmões (PRATA *et al.*, 2020).

A introdução de partículas de poliestireno através da traqueia, em um modelo em *hamster*, demonstrou aumentar o influxo de neutrófilos, o conteúdo de histamina e resposta inflamatória pulmonar. Esses achados foram demonstrados nos índices de amostras de lavado broncoalveolar e também trombose periférica dentro de 1 h após a instilação, o que demonstrou a capacidade rápida do poliestireno aminado (acrescido de uma amina) em passar dos pulmões para a circulação sistêmica. O poliestireno aminado demonstrou capacidade de aumentar a formação de trombos quando administrado por via intratraqueal, porém, esse efeito só foi observado em uma concentração quase dez vezes maior do que seria necessária para produzir um efeito semelhante utilizando a via de administração intravenosa (LETT *et al.*, 2021).

Quanto a estudos em modelos humanos, Amato-Lourenço *et al.* (2021) demonstraram, após analisarem amostras de tecido pulmonar de 20 indivíduos adultos, que o sistema respiratório é uma rota de exposição a microplásticos e os pulmões humanos são um sítio de deposição dessas partículas. As amostras analisadas foram coletadas de indivíduos submetidos ao serviço de necropsia para determinação da causa de morte. Todos os indivíduos que tiveram o pulmão analisado residiram na cidade de São Paulo por um período de tempo maior que dez anos. Ao final do estudo foram detectadas, no total, 31 partículas e fibras de polímeros sintéticos em treze das vinte pessoas analisadas. Conforme foi concluído nesse estudo, embora a inalação tenha sido a mais provável via de exposição, não pode ser excluída a possibilidade de que algumas dessas partículas possam ter atingido os pulmões por meio de translocação sistêmica. Pois, assim como as partículas que se depositam no sistema respiratório podem migrar para o sistema circulatório ou linfático e atingir outros órgãos e tecidos, o mesmo pode ocorrer com outras vias de exposição.

As partículas que se depositam nos pulmões ainda podem estar submetidas ao processo de fagocitose pelos macrófagos, o que também pode fazer com que ocorra a translocação dessas partículas. No entanto, a grande área de superfície dessas partículas pode desencadear uma intensa liberação de fatores quimiotáticos, que aumentam a permeabilidade e impedem o deslocamento dos macrófagos, levando a um processo de inflamação crônica (PRATA *et al.*, 2020).

### 3.2.3 Contato com a pele

Microplásticos são utilizados em cosméticos e produtos de higiene, como produtos de limpeza para as mãos, protetores solares, produtos de limpeza facial, creme dental e outros. Recentemente, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o *Microbeads-Free Water Act* com o objetivo de restringir o uso de microplásticos nesses tipos de produtos e assim minimizar o seu descarte em sistemas de água. Essa lei é válida para produtos produzidos após o ano de 2018. No período que antecede essa norma de restrição, usuários de esfolientes faciais foram expostos a uma média de 4.594 a 94.500 partículas de microplásticos ao fazerem o uso de apenas 5 mL de produto (LETT *et al.*, 2021).

Segundo o *Cosmetics Europe* aproximadamente 93% dos microplásticos usados em produtos de limpeza de pele são polietileno e os demais componentes incluem, principalmente, polipropileno e poliestireno (KENTIN *et al.*, 2017; LETT *et al.*, 2021). Atualmente, não são bem compreendidos os efeitos diretos de microplásticos na saúde humana (PRATA *et al.*, 2020).

O Instituto Federal Alemão de Avaliação de risco discorreu a respeito dos perigos para saúde humana resultantes do uso de produtos de cuidados com a pele e higiene bucal contendo partículas microplásticas de Polietileno (PE). Após análises concluíram que as partículas microplásticas usadas em *peelings* faciais e produtos de banho são maiores do que 1  $\mu\text{m}$ , e que o uso prolongado desses produtos leva à absorção de partículas de PE e também Polipropileno (PP) pelos tecidos, o que pode resultar, eventualmente, em danos à pele humana (SHARMA; CHATTERJEE, 2017).

Embora a rota de contato com a pele seja a menos significativa, deve-se levar em consideração o fato de que alguns plásticos são capazes de causar uma inflamação leve na pele, por serem considerados corpos estranhos. Como por exemplo as suturas, dependendo do tipo de material utilizado, podem gerar um processo inflamatório leve. Além do epitélio celular também sofrer estresse oxidativo através da exposição a micro e nanoplásticos (PRATA *et al.*, 2020).

### 3.2.4 Toxicidade e estresse oxidativo

Dependendo da exposição, o contato com microplásticos podem levar ao estresse oxidativo, citotoxicidade e até mesmo à neurotoxicidade (PRATA *et al.*, 2020).

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os sistemas antioxidantes pode resultar em estresse oxidativo e os microplásticos podem estar presentes na origem dele. Alguns compostos (metais) podem ficar adsorvidos na grande área de superfície dos plásticos, liberando espécies oxidativas que podem culminar em estresse (RAHMAN *et al.*, 2021). A presença de microplásticos no organismo pode desencadear respostas inflamatórias, uma vez que o sistema imunológico age para eliminar esse material do organismo. Durante o processo inflamatório ocorre a liberação de ROS e também o aumento da permeabilidade das barreiras epiteliais, o que pode ocasionar a translocação dos microplásticos para os outros tecidos. A presença de microplásticos pode levar a um processo de inflamação crônica, o que aumenta o risco de desenvolvimento de câncer (PRATA *et al.*, 2020). O estresse oxidativo decorrente da exposição a microplásticos foi relatado em peixes – zebra e em camundongos (LU *et al.*, 2016).

A neurotoxicidade, relacionada a doenças neurodegenerativas, foi relatada *in vivo* após a exposição a materiais particulados. Isso ocorre, possivelmente, devido ao estresse oxidativo e o contato direto com partículas translocadas, que causam a ativação da microglia no cérebro (célula imune), que produz superóxido, e a ação de citocinas pró-inflamatórias circulantes (de outros locais de inflamação), resultando em neurodegeneração. Através dos mesmos mecanismos os microplásticos podem contribuir à crescente incidência de doenças neurodegenerativas (PRATA *et al.*, 2020).

A citotoxicidade é considerada como resultado da toxicidade, estresse oxidativo e processo inflamatório. A internalização celular de microplásticos de poliestireno têm sido descrita em culturas de células, incluindo macrófagos, eritrócitos e também células epiteliais alveolares de ratos (GEISER *et al.*, 2005; PRATA *et al.*, 2020). Após a internalização, os microplásticos não permanecem ligados à membrana dentro da célula, levando a acreditar que eles podem, potencialmente, interagir com as estruturas celulares (MOHANKUMAR *et al.*, 2008; PRATA *et al.*, 2020).

Outro ponto importante que pode estar relacionado a citotoxicidade, levando a morte celular, são as moléculas de surfactante que são tipicamente encontradas na maioria das preparações de materiais plásticos. Em altas concentrações podem ser prejudiciais para a bicamada lipídica da membrana plasmática. Mesmo que em níveis moderados, os surfactantes podem interromper importantes estruturas da superfície celular, como proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular. Podem ainda dificultar os processos de sinalização celular que requerem interações de ligante extracelular e receptor de superfície celular. Levando em consideração todos esses fatores, a fisiologia celular seria afetada em vários graus por surfactantes associados a plásticos (CAMPANALE *et al.*, 2020).

### 3.2.5 Corrente sanguínea e tecidos

Após ingestão ou inalação, os microplásticos podem sofrer translocação e alcançar o sistema circulatório e uma vez que estejam na corrente sanguínea podem alcançar diferentes órgãos e tecidos e inclusive se acumular neles (PRATA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Através da via de inalação qualquer tipo de micropartícula pode atingir a superfície alveolar e partículas nanométricas podem facilmente passar para a corrente sanguínea, ultrapassando a barreira epitelial pulmonar e se difundir. Essa distribuição pode causar danos a diferentes regiões do corpo, incluindo o sistema nervoso central (FACCIOLÀ *et al.*, 2021).

Deng *et al.* (2017) avaliaram, em camundongos, o acúmulo de microplásticos nos tecidos. Os camundongos foram tratados com água contendo partículas de microplásticos de poliestireno fluorescentes de tamanho 5  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$ . Fazendo uso dessas partículas, e com a ajuda de espectroscopia de fluorescência e análises histológicas foi possível rastrear o acúmulo e a distribuição de microplásticos nos fígados, rins e intestinos. Foram observados microplásticos de ambos os tamanhos em todos os três tecidos e após 14 dias de exposição o valor de exposição se tornou estagnado. Os dados obtidos sustentam a hipótese de que os microplásticos não apenas acumulam no sistema digestivo, mas que também são transportados para outros tecidos através do sistema circulatório. Sendo que, a distribuição das microplásticos nos tecidos é determinada, em partes, pelo tamanho das partículas, onde as partículas grandes (20  $\mu\text{m}$  de diâmetro) apareceram continuamente

distribuídas entre todos os tecidos, enquanto as partículas pequenas (5  $\mu\text{m}$  de diâmetro) apresentaram maior acúmulo no intestino.

Apesar da grande maioria dos estudos relacionados a microplásticos serem testados em modelo animal, geralmente em ratos e camundongos, existem relatos da presença de microplásticos em amostras de pulmões e placenta humana, que servem para embasar a teoria de translocação e deposição dessas partículas nos órgãos e tecidos (AMATO-LOURENÇO *et al.*, 2021; RAGUSA *et al.*, 2021).

Na corrente sanguínea, partículas de poliestireno menores que 10  $\mu\text{m}$ , em altas concentrações, mostraram exibir propriedades hemolíticas. Embora o mecanismo exato ainda não esteja bem compreendido, uma hipótese estaria associada ao aumento área de superfície das partículas à medida que o seu tamanho diminui, resultando em aumento da adesão dessas partículas aos eritrócitos por meio de interações de força de Van der Waals (LETT *et al.*, 2021).

Existem relatos da interação de nanoplásticos com proteínas do sangue, como albumina e globulina, para formarem complexos proteína – plástico. Esses complexos agregados, se presentes em grandes quantidades, podem potencialmente levar ao bloqueio dos vasos sanguíneos. Além disso, nanoplásticos quando encontrados em altíssimas concentrações (cerca de 10 a 50 vezes mais) em relação as hemácias, apresentam danos as mesmas causados por estresse mecânico, osmótico e oxidativo, embora seja muito difícil de se obter uma acumulação de nanoplásticos tão grande na circulação humana em condições naturais (YONG; VALIYAVEETIL; TANG, 2020).

Quanto aos efeitos cardiovasculares, um estudo realizado em 2019 por Wang *et al.* (2019) utilizando peixes *marine medaka* (*Oryzias melastigma*) avaliou ao longo de uma geração as interferências resultantes da exposição aos microplásticos. Começando com a exposição dos pais a concentrações de microplásticos baixas (10  $\mu\text{m}$  de poliestireno não modificado) que resultou em uma diminuição da frequência cardíaca. Existem muitos fatores em potencial que podem ter contribuído para a diminuição observada na frequência cardíaca.

Segundo relatado por GEISER *et al.* (2005), nanoplásticos de poliestireno foram encontrados no interior das células, ao invés de permanecerem ligados a membrana, o que pode criar um potencial de interação do poliestireno com sarcômeros cardíacos, e posteriormente impactar a frequência cardíaca. Além de,

como já mencionado anteriormente, os microplásticos apresentarem um potencial de causar estresse oxidativo, que podem ocasionar efeitos cardiovasculares

Os distúrbios cardiovasculares devido ao estresse oxidativo que ocorrem a partir do poluentes do ar, dentre eles os microplásticos, são devido em parte a um aumento de espécies reativas de oxigênio, que interagem com a sinalização do óxido nítrico que ocorre nas células endoteliais convertendo-o em peroxinitrito citotóxico. Isso faz com que a biodisponibilidade do óxido nítrico no endotélio diminua, e as concentrações de peroxinitrito estejam altas, uma vez que o peroxinitrito é citotóxico, resultada em danos ao DNA, proteínas, e lipídios nas células (GORI; MÜNDEL, 2011;LETT *et al.*, 2021).

### 3.2.6 Vetores de microrganismos e produtos químicos potencialmente tóxicos

Além de poder liberar constituintes químicos presentes em suas matrizes no organismo, os microplásticos também podem atuar como vetores de microrganismos ou produtos químicos adsorvidos do meio ambiente, devido a sua grande área superficial que os torna propensos a carrear produtos que entrem em contato com eles ou microrganismos que estejam colonizando sua superfície (BANAEI *et al.*, 2020; SHARMA; CHATTERJEE, 2017). Os efeitos causados por produtos químicos ou microrganismos adsorvidos aos microplásticos serão altamente dependentes de algumas variáveis, como o tipo de partículas ingeridas, o tempo de depuração e translocação de microplásticos vetoriais, a taxa de liberação e extensão do contaminante e os efeitos nocivos que ele pode ter em tecidos humanos (PRATA *et al.*, 2020).

Alguns constituintes químicos são utilizados no tratamento do plástico para conferir algumas melhorias ao material. Como é o caso de plastificantes e outros aditivos (retardadores de chama, antioxidantes, anti-UV, nano-enchimentos). Uma vez que ocorra a ingestão de partículas de microplásticos, pode haver a liberação dessas substâncias químicas no organismo. Grande parte desses compostos não possuem seus danos bem documentados (SHARMA; CHATTERJEE, 2017).

Aditivos plásticos, como bisfenol A e ftalatos (usados para garantir maior flexibilidade no plástico), são considerados extremamente tóxicos, além de terem demonstrado um efeito biológico no útero que pode estar associado a uma diminuição

do tempo de gravidez. Esses compostos ainda agem como disruptores endócrinos, ou seja, ambos, mesmo que em concentrações muito baixas interferem com os hormônios endógenos causando desregulação do sistema endócrino e afetando o funcionamento dos órgãos que respondem aos sinais hormonais (BLACKBURN; GREEN, 2021; PRATA *et al.*, 2020; SHARMA; CHATTERJEE, 2017). A ação dos disruptores endócrinos está relacionada a sua capacidade de (a) imitar hormônios, (b) antagonizar sua ação, (c) alterar seu padrão de síntese e metabolismo, ou (d) modificar as expressões de receptores específicos. As pesquisas têm associado os disruptores endócrinos a várias doenças e condições como: asma, diabetes, cânceres (mama, próstata, testículos), problemas reprodutivos (malformações genitais, infertilidade) e condições do neurodesenvolvimento (distúrbios de aprendizagem, transtorno do espectro autista) (CAMPANALE *et al.*, 2020).

Alguns compostos adsorvidos do meio ambiente pelos microplásticos incluem: poluentes orgânicos persistentes, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e bifenilas policloradas, que são compostos potencialmente tóxicos e ingestão de microplásticos, contendo esses poluentes, expõem o organismo a altas concentrações desses produtos e podem até mesmo potencializar sua toxicidade (DE-LA-TORRE, 2019; PRATA *et al.*, 2020). Outros poluentes conhecidos por serem capazes de adsorver aos plásticos incluem metais pesados, como chumbo, cádmio, zinco, níquel e contaminantes orgânicos, como produtos farmacêuticos (RIBEIRO *et al.*, 2019).

No caso dos microrganismos, os microplásticos podem direcionar microrganismos patogênicos aos tecidos, ao mesmo tempo que os protegem da ação do sistema imunológico, podendo acarretar danos e favorecendo infecções. Como por exemplo, o *Vibrio spp*, uma espécie capaz de colonizar a superfície de microplásticos (DE-LA-TORRE, 2019; PRATA *et al.*, 2020).

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS

Fragmentos plásticos podem ser definidos e descritos de diversas maneiras. As descrições mais frequentemente encontradas são: tamanho, forma (esferas, contas, pelotas, espumas, fibras, fragmentos, filmes e flocos), cor (branco-transparente, amarelo-laranja, vermelho-rosa, azul esverdeado ou preto acinzentado), tipo de polímero, origem e finalidade de uso, por exemplo, embalagem (ABBASI; TURNER, 2021; NAPPER; THOMPSON, 2020). O tamanho é característica mais



comumente relatada em pesquisas, porém, pode haver ambiguidade na terminologia utilizada para designar os tamanhos de plásticos, o que compromete e dificulta significativamente o progresso dos estudos relacionados a contaminantes plásticos (NAPPER; THOMPSON, 2020).

Existem três categoriais mais comumente utilizadas para descrever o tamanho do fragmento plástico: macrolásticos (> 20 mm de diâmetro), mesoplásticos (5–20 mm) e microlásticos (<5 mm). No entanto, os nanoplásticos estão sendo relatados com mais frequência (<1000 nm) (DEHAUT *et al.*, 2016; NAPPER; THOMPSON, 2020).

Quanto ao tipo de polímero, embora existam inúmeros tipos, os que aparecem com maior frequência em análises de microlásticos são: Polietileno, polipropileno e poliestireno, que são comumente usados na produção de embalagens (HIDALGO-RUZ *et al.*, 2012). Além desses citados, vestígios de fibras de poliamida, as quais são usadas como redes de pesca e na indústria têxtil, também são achadas, porém, com menor frequência (DÜMICHEN *et al.*, 2017).

A determinação de microlásticos é uma tarefa complicada, que exige a realização de técnicas bastante minuciosas afim de evitar erros. O processo de análise exige que as instalações utilizadas durante as análises estejam livres de partículas contaminantes, principalmente de partículas de ar ambiente que possam estar presentes no processo de preparação e análises das amostras (WELLE; FRANZ, 2018).

Segundo Pan *et al.* (2019), embora a metodologia de referência para análise de microlásticos não tenha sido estabelecida, o seguinte procedimento tem sido amplamente utilizado: (1) coleta de microlásticos; (2) isolamento de microlásticos (separação, digestão, filtração, secagem); (3) identificação visual; (4) Caracterização por Transformada de Fourier Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)/ Micro-Raman/ Elétron de Varredura Espectroscopia Dispersiva de Microscopia-Energia (SEM-EDS) e por fim , (5) atribuição de identidade.

Após realizada a coleta das amostras, a etapa de isolamento de microlásticos consiste no tratamento para redução do teor de matéria orgânica presente para que então possam ser realizadas as análises das amostras (CARVALHO *et al.*, 2021). Protocolos distintos foram criados para a extração de microlásticos de sedimentos e tecidos biológicos devido a diversidade de composição da matéria orgânica presente nas amostras (DEHAUT *et al.*, 2016).

Os métodos de extração podem ser classificados como ácidos, alcalinos, oxidantes e enzimáticos. A digestão da matéria orgânica pode ser obtida da incubação da amostra com uma substância ácida, como ácido nítrico, ou uma solução básica, como o hidróxido de potássio (KOH). Peróxidos, como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e enzimas também podem ser utilizadas (DEHAUT *et al.*, 2016; RADFORD *et al.*, 2021). A ineficácia da digestão de matéria orgânica por meio de diferentes protocolos e matrizes motivaram o uso de uma digestão em múltiplas etapas, ou seja, utilizando dois reagentes diferentes, embora em muitos estudos ainda optem por utilizar apenas um único reagente, de acordo com a sua amostra analisada (CARVALHO *et al.*, 2021; DEHAUT *et al.*, 2016).

A seleção do protocolo ou adaptação de um protocolo já existente para o isolamento de microplásticos deve levar em consideração os objetivos do estudo e a matriz estudada. Alguns métodos não se tornam viáveis para serem utilizados em larga escala por serem muito demorados ou muito caros ou ainda deficientes na digestão de tecidos biológicos. Alguns protocolos utilizados na digestão de tecidos biológicos podem causar danos aos plásticos após o processo de digestão, como é o caso dos protocolos utilizando ácido nítrico que causam degradação substancial de alguns tipos de poliamida, o que pode levar a subestimações de microplástico mascarando os níveis reais desse material (DEHAUT *et al.*, 2016).

Após realizado o isolamento, podem ser utilizadas técnicas de microscopia (óptica e eletrônica) para identificação e caracterização visual das amostras. Já a identificação química, que garante a identidade da amostra, pode ser realizada através de espectroscopia (Raman, Ressonância Magnética Nuclear e Infravermelho por Transformada de Fourier) (SHARMA; CHATTERJEE, 2017).

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (de 300.000 x ou mais) e resolução. Permite, também, a análise em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que gera, para a maior parte dos materiais sólidos, uma aparência tridimensional da imagem da amostra analisada (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; MALISKA, 2021).

O princípio da microscopia eletrônica de varredura consiste em irradiar a área de superfície ou o microvolume da amostra a ser analisada com um fino feixe de elétrons através de um filamento, geralmente de tungstênio, que mediante uma aplicação de diferença de potencial gera uma variação de voltagem e permite a

modificação na aceleração dos elétrons (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; FERRARI *et al.*, 2019).

Ao interagir com a superfície da amostra esse feixe emite uma série de radiações como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios-X característicos e etc, que quando captadas corretamente fornecem informações sobre as características da amostra (MALISKA, 2021). Após varrer a superfície da amostra, ponto a ponto, o sinal do detector é transmitido a um monitor que mostra na forma de imagem a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação emitida pela luz a qual estamos habitualmente acostumados no microscópio óptico convencional (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A microscopia eletrônica de varredura de alta resolução utiliza um canhão de emissão de campo (FEG) que substitui o filamento convencional. O FEG consiste de uma ponta de tungstênio extremamente fina que conduz a uma melhor resolução, além de criar campos elétricos intensos em formas pontiagudas que permitem a ampliação da superfície em milhares de vezes com uma pequena voltagem de aceleração de elétrons, reduzindo efeitos de acúmulos de cargas nas superfícies de materiais isolantes e a profundidade de penetração do feixe (BARRETO, 2014).

Além de fornecer informações sobre a morfologia, o MEV também pode apresentar a identificação dos elementos químicos presentes na amostra. Na configuração do microscópio eletrônico pode-se acoplar, junto a câmara da amostra, dois tipos de detectores de raios-X: o detector por dispersão de energia (EDS) ou o detector por dispersão em comprimento de onda (WDS), sendo o EDS o mais usado devido sua maior confiabilidade e facilidade de operação (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; MALISKA, 2021).

Os detectores de raios – X fornecem informações qualitativas e quantitativas da composição da amostra com base na interação do feixe de elétrons primários com a superfície analisada. A amostra é bombardeada por um feixe de elétrons primários que faz com que os elétrons mais externos dos átomos e os seus constituintes sejam excitados para mudarem de nível energético e ao retornarem para sua posição inicial liberam a energia adquirida na forma de fóton. Uma vez que os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, o detector mede esse comprimento de onda ou energia associada através da incidência do feixe e determina quais elementos químicos estão presentes naquela amostra que estão emitindo a radiação. Então é possível traçar um histograma do espectro com a abscissa sendo a energia

dos fótons e a ordenada o número de fótons recebidos (contagem) (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A análise dos picos obtidos no espectro é facilitada por uma base de dados que contém, para cada elemento, as energias e a intensidade das raias que as produziu, então é possível localizar para cada energia do espectro a lista dos elementos que possuem uma raia dentro deste domínio energético, assim determinando os elementos presentes na amostra (COSTA, 2016; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Vale salientar, que os elementos com quantidade de massa inferior a 0,2% não poderão ser detectados. Por isso é importante escolher uma tensão de aceleração compatível com os elementos que se quer analisar (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e o Raman são duas técnicas de espectroscopia que identificam grupos funcionais associados as diferentes moléculas presentes na amostra. Cada material apresenta bandas vibracionais características, relacionadas com seus grupos funcionais, que criam sua “impressão digital” e essa é utilizada para determinar a sua identificação. (SCHMID; COZZARINI; ZAMBELLO, 2021).

O FTIR utiliza uma radiação infravermelha policromática (número de onda:  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo a um comprimento de onda de  $2,5\text{--}25\text{ }\mu\text{m}$ ) para examinar a amostra. Os espectrômetros mais modernos podem utilizar a técnica de FTIR nos modos de absorção, transmissão ou reflexão (KÄPPLER *et al.*, 2016; SCHMID; COZZARINI; ZAMBELLO, 2021). Com maior frequência são utilizadas: reflexão total atenuada FTIR, utilizada em peças de tamanho macroscópico ( $> 500\text{ }\mu\text{m}$ ) que sejam compostas de material sólido e o detector de micro-FTIR de matriz de plano focal, que permite identificar partículas presentes em um filtro com uma resolução entre  $10\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$  de tamanho, sendo  $10\text{ }\mu\text{m}$  o menor tamanho de partículas individuais passíveis de serem detectadas através dessa metodologia de FTIR (SCHMID; COZZARINI; ZAMBELLO, 2021; SCHWAFERTS *et al.*, 2019).

O episódio de dispersão de uma radiação eletromagnética monocromática através de uma fonte de laser (visível, infravermelho próximo ou radiação ultravioleta (UV) próximo) caracteriza o processo de funcionamento da técnica Raman (SCHMID; COZZARINI; ZAMBELLO, 2021). O mapeamento Raman oferece a possibilidade de identificar microplásticos na faixa de  $1\text{ e }20\text{ }\mu\text{m}$  (ARAUJO *et al.*, 2018). Ao interagir com a matéria, a radiação produz dois tipos de dispersão: a elástica e a inelástica,

sendo a inelástica proveniente da interação do laser com a amostra. Essa interação gera uma troca de energia que fornece informações sobre a modos vibracionais no sistema (SCHMID; COZZARINI; ZAMBELLO, 2021). Para análise de partículas menores é utilizado o  $\mu$ -Raman, que é uma técnica Raman convencional simplesmente com resolução aprimorada que é limitada pelo limite de difração de campo distante (AYARS *et al.*, 2001).

O deslocamento Raman, para uma determinada ligação e um determinado modo vibracional não é dependente da energia de excitação. Contudo, o uso de lasers com energias mais baixas no campo espectroscopia de infravermelho próximo é aconselhada, uma vez que laser com altas frequências (UV, visível) podem gerar fenômenos indesejados de fluorescência, ou até mesmo fotodecomposição do material. Outra preocupação é a presença de aditivos e corantes presentes na amostra de microplástico que pode gerar espectros anormais ou até mesmo cobrir o sinal (SCHMID; COZZARINI; ZAMBELLO, 2021). Existem muitas rotas possíveis para minimizar esses problemas. No contexto específico da análise de microplásticos, uma forma óbvia de reduzir a fluorescência causada por detritos orgânicos e, em alguns casos, até por corantes orgânicos é a utilização de um protocolo de limpeza adequado para remover os contaminantes. Digno de menção é o estudo de referência de Dehaut *et al.* (2016) que avaliou a eficiência e o efeito de degradação de seis métodos. Os autores concluíram que a digestão com ácido nítrico, recomendada anteriormente pelo Conselho Internacional para a Exploração do Mar, leva a degradação do polímero e consequente subestimação de microplásticos. Ao invés disso, os autores recomendaram a digestão em uma solução de KOH a 10% (ARAUJO *et al.*, 2018).

Ambas as técnicas, FTIR e Raman, atuam de modo complementar na detecção das vibrações moleculares, uma vez que algumas vibrações não podem ser detectadas em FTIR mas são ativas em Raman e vice versa, já que o Raman apresenta uma maior sensibilidade para grupos apolares e sofre menos interferência na presença de água, diferente do FTIR. Contudo, a técnica de Raman em apresenta melhor resolução (até 1  $\mu$ m enquanto a do FTIR é 10 e 20  $\mu$ m) quando comparada a espectroscopia FTIR (ARAUJO *et al.*, 2018; SCHMID; COZZARINI; ZAMBELLO, 2021).

Um levantamento na literatura mostra que a técnica de identificação mais utilizada é Espectroscopia infravermelha de transformada de Fourier (FTIR), seguida de microscopia óptica e por espectroscopia Raman (SCHMID; COZZARINI;

ZAMBELLO, 2021). Também vale ressaltar que a técnica de microscopia Raman foi aplicado com sucesso para caracterizar microplásticos, mostrando algumas vantagens sobre a técnica micro FTIR, especialmente quando o tamanho das microfibras é inferior a 20  $\mu\text{m}$  (ABSHER *et al.*, 2018).

### 3.4 BOLSAS DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS

As plaquetas são pequenos fragmentos provenientes do citoplasma de células gigantes chamadas de megacariócitos. Quando ativadas elas aderem ao endotélio do vaso sanguíneo que sofreu uma lesão, juntamente com outras plaquetas, ou somente se ligam as outras plaquetas, para formar agregados que têm como função a prevenção ou a interrupção do sangramento (TOSTES *et al.*, 2008). As plaquetas estão presentes no sangue total junto com os outros elementos, como o plasma, os leucócitos (glóbulos brancos) e as hemácias (MATHEW *et al.*, 2021).

O concentrado de plaquetas é um hemocomponente, ou seja, ele é um produto gerado em serviços de hemoterapia, de forma individualizada, a partir de uma amostra de sangue total extraída de um doador, a qual é submetida a processos físicos (centrifugação) que resultarão na obtenção desse componente. Além da coleta de sangue total pode ser utilizada a metodologia de aférese, na qual ocorre a retirada do sangue do doador, seguida da separação de seus componentes por um equipamento próprio, sendo que a porção do sangue que se deseja fica retida na máquina e os outros componentes que não serão utilizados são devolvidos ao doador (BRASIL,2015).

Para capturar as plaquetas a partir de uma amostra de sangue total são utilizadas duas metodologias. O primeiro método baseia – se na centrifugação do sangue em duas etapas, sendo que na primeira etapa é realizada uma centrifugação leve aonde se obtém o plasma rico em plaquetas. Uma centrifugação adicional é realizada, dessa vez em alta rotação, e é feita a remoção da maior parte do sobrenadante de plasma. O componente final componente deve conter uma suspensão de plaquetas em quantidade de plasma adequada manter um pH aceitável, geralmente 40 a 70 mL são usados (UNITED STATES, 2005).

O segundo método utilizado leva em consideração a diferença de tamanho e densidade das células para separação dos componentes sanguíneos e geralmente utiliza extratores automatizados de plasma e bolsas *top and bottom*. O processo de

centrifugação refrigerada que faz com que o sangue se divida em camadas, as hemácias se depositam no fundo da bolsa, acima delas se encontra o *buffy coat* (camada leucoplaquetária), aonde estão localizados os leucócitos e plaquetas e na base se encontra a camada de plasma, que contém plaquetas dispersas. O plasma sobrenadante contendo plaquetas dispersas é transferido para uma bolsa-satélite, pela saída superior (*top*) da bolsa e o concentrado de hemácias é extraído pela saída inferior (*bottom*) da bolsa. A camada leucoplaquetária permanece na bolsa de origem. A camada leucoplaquetária de cada bolsa pode ser agrupada com outras por meio de metodologia estéril, seguido de etapas de sedimentação ou centrifugação para a separação e transferência das plaquetas para uma outra bolsa-satélite, onde ficam armazenadas em *pool* (concentrado de várias amostras). Este método possibilita a redução no teor de leucócitos contaminantes em aproximadamente 90% (BRASIL, 2015; UNITED STATES, 2005).

O produto final do concentrado plaquetário é um condensado de plaquetas suspensas em plasma. O plasma consiste na porção acelular do sangue e pode ser obtido por centrifugação, sua constituição é basicamente água, proteínas (albumina, globulinas) fatores de coagulação (fibrinogênio), carboidratos, lipídios e outros como eletrólitos (sódio, potássio, bicarbonato, cloreto e cálcio) e imunoglobulinas (BRASIL, 2015; MATHEW *et al.*, 2021). Sendo que cada de concentrado de plaquetas contém aproximadamente  $5,5 \times 10^{10}$  plaquetas em 50-60mL de plasma, já as bolsas obtidas por aférese contém têm pelo menos  $3,0 \times 10^{11}$  plaquetas em 200-300mL de plasma (correspondente a 6 a 8 unidades de concentrados de plaqueta unitários) (BRASIL, 2015).

Após a preparação as amostras de concentrados de plaquetas permanecem estáveis pelo período de 3 a 5 dias, desde que se mantenham em agitação constante e estejam bem condicionadas (BRASIL, 2016). Sendo utilizadas, principalmente, por pacientes trombocitopênicos, que apresentam baixa quantidade desse componente no sangue devido ao déficit na produção medular e também, em alguns casos, por pacientes submetidos a grandes cirurgias (TOSTES *et al.*, 2008).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

Foram analisadas 15 bolsas de concentrados de plaquetas doadas pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar) localizado na cidade de Ponta Grossa, Paraná. O Hemepar é responsável pela coleta, armazenamento, processamento, transfusão e distribuição de sangue para hospitais públicos, privados e filantrópicos. As amostras de sangue total provêm de doações voluntárias da população em geral e são processadas para obtenção de vários hemocomponentes, entre eles o concentrado plaquetário.

Os concentrados plaquetários são armazenados em bolsas produzidas pela *Fresenius HemoCare Brasil Ltda*, com capacidade para 1300mL de amostra, confeccionadas em Policloreto de Vinila atóxico, porém, segundo informações do próprio fabricante, o material possui em sua composição DEHP (di(2-etilhexil)ftalato), um agente plastificante suspeito de ser tóxico à reprodução, devendo ser evitado o tratamento repetido ou prolongado de crianças, gestantes ou lactantes com este produto.

Na etiqueta de identificação das bolsas é possível encontrar as iniciais do doador, volume da bolsa, tipagem sanguínea do doador, assim como a data da coleta e do vencimento do hemocomponente, conforme mostrado na Figura 1. Todas os materiais analisados se encontravam fora do prazo de validade, ou seja, eram considerados inaptos para uso.

As bolsas utilizadas nesse estudo possuíam a mesma data de vencimento (08/09/21) e foram coletadas no dia seguinte a essa data e processadas logo em seguida. Durante seu processamento foram armazenadas sob refrigeração em geladeira (3°C).



Figura 1 - Bolsa de concentrado de plaquetas



Fonte: A autora,2022.

## 4.2 CONTROLE DE QUALIDADE E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Uma abordagem livre de plástico foi utilizada para garantir a qualidade dos resultados, o que permitiu a avaliação de fontes de variabilidade e erro e também trouxe maior confiabilidade aos dados coletados. Todos os materiais foram lavados , antes de serem utilizados, com glicerol P.A e álcool 70% e secos com o auxílio de toalhas de papel. Esses materiais foram mantidos em fluxo laminar limpo (antes e após o processamento das amostras) para evitar a contaminação das amostras no ar. Jalecos de algodão (100%) e luvas de nitrila limpas foram usadas durante todos os procedimentos.

As amostras foram processadas em um gabinete de fluxo laminar limpo, previamente higienizado com álcool 70%. Por conta da presença de microplásticos no ar foi realizado um controle de qualidade durante o processamento das amostras, aonde foram colocados vidros relógio, também previamente higienizados, nos locais em que as amostras foram manipuladas. Esses vidros foram analisados, posteriormente, quanto a presença de estruturas com características físicas e visuais compatíveis com materiais plásticos.

Foram retirados, com auxílio de uma tesoura cirúrgica, dois fragmentos de pontos distintos do material plástico que compõe a bolsa de armazenamento de plaquetas. Essas amostras foram coletadas em frascos de vidro de Penicilina injetável

esterilizados e posteriormente submetidas ao processo de digestão, que é tratamento utilizado para a redução do teor de matéria orgânica presente na amostra. Um terceiro fragmento da bolsa, maior, foi retirado e armazenado para que fosse realizada a técnica de FTIR. Esse fragmento não foi submetido ao processo de digestão pois foi retirado de um ponto que não teve contato com o concentrado de plaquetas.

Para análise do concentrado de plaquetas foi retirada uma alíquota de 10 mL de cada bolsa, e colocada em tubos cônicos graduados após a perfuração da membrana de um dos conectores da bolsa, que permitiu a passagem do concentrado de plaquetas para os tubos. Os tubos e as bolsas foram numerados de 1 a 15 para facilitar a identificação das amostras. Após a identificação os tubos foram submetidos ao processo de centrifugação leve em rotação padrão durante 10 minutos. Após a centrifugação, foi realizada a separação de sobrenadante e precipitado com auxílio de pipetas de vidro. Amostras de precipitado foram identificadas no tubo com a letra A e as amostras de sobrenadante foram transferidas para tubos de ensaio e marcadas com a letra B. Essas amostras também foram, subsequentemente, submetidas ao processo de digestão juntamente com os fragmentos da bolsa, contudo, as amostras de sobrenadante passaram por uma etapa adicional antes, a de filtração a vácuo.

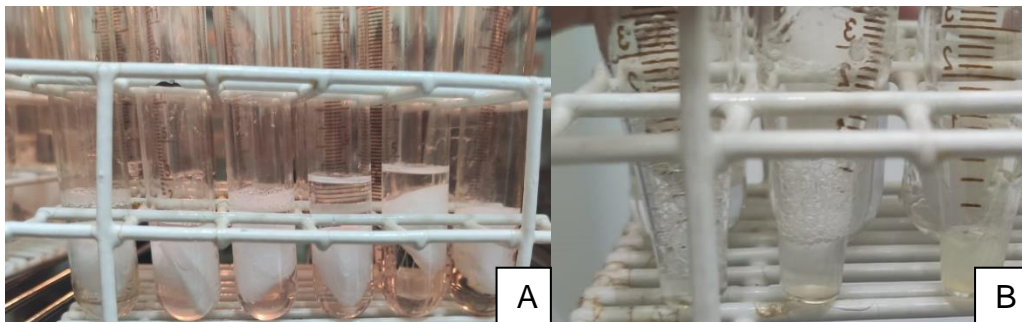
#### 4.3 FILTRAÇÃO E DIGESTÃO DAS AMOSTRAS

Para o procedimento de filtração a vácuo das amostras de sobrenadantes foram utilizados filtros de microfibras de vidro (GF/C Whatman, 47 mm de diâmetro com retenção de partículas 1.2 µm) individualizados. Cada amostra foi filtrada uma única vez, e após a sua passagem pelo filtro as partículas sólidas que exibiram tamanho compatível com a porosidade apresentada pelo filtro ficaram retidas. Ao final de cada procedimento, o filtro da respectiva amostra foi dobrado, com o auxílio de uma pinça de metal, e colocado dentro de um tubo de ensaio identificado.

Nesse estudo foi utilizado o protocolo de digestão em duas etapas conforme Carvalho *et al.* (2021), com algumas adaptações. Dois reagentes diferentes foram utilizados para otimizar o processo de digestão do material, o hidróxido de potássio (KOH) em solução de 10% (p/p) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 35%. Primeiramente foi adicionado quantidade suficiente de peróxido de hidrogênio para cobrir completamente as amostras conforme observado na Figura 2, sendo que para as amostras de sobrenadante era necessário cobrir o filtro e para as amostras de plástico

da bolsa era necessário submergir o material, já as amostras de precipitado tiveram adicionado em média 1 mL de  $H_2O_2$ , levando em consideração que a retirada de sobrenadante já havia resultado em uma quantidade de precipitado equivalente a 1 mL para a maioria das amostras. As amostras foram tampadas com papel alumínio e incubadas em estufa com temperatura controlada a  $60^\circ C$  durante um período de 48 horas.

Figura 2 - Amostras com adição de  $H_2O_2$



Legenda: (A) Amostras de sobrenadante e (B) Amostras de precipitado.  
Fonte: A autora, 2022.

A completa digestão das amostras foi avaliada visualmente, e por se tratar de um procedimento experimental, o qual foi adaptado de metodologias para análise de microplásticos em amostras ambientais, estabeleceram-se critérios de acordo com cada amostra analisada. Para as amostras de plástico da bolsa considerou-se a completa digestão quando já não haviam mais resíduos líquidos presentes em suas superfícies e o peróxido de hidrogênio colocado também já havia sido evaporado completamente. Já as amostras de precipitado que resultaram em um particulado sólido, ausente de resquícios líquidos e de  $H_2O_2$  também foram consideradas já digeridas. Quanto as amostras de sobrenadante, a completa digestão inclui a evaporação do  $H_2O_2$  e a degradação do filtro, resultando em um particulado sólido.

Amostras que não preenchem os critérios de digestão completa permaneceram na estufa em um novo ciclo de 48 horas com o objetivo de obter a digestão dos resíduos líquidos por completo, evaporação do  $H_2O_2$  e degradação dos filtros, conforme mencionados acima. A temperatura da estufa foi elevada para  $70^\circ C$  no primeiro dia e para  $80^\circ C$  no dia seguinte. Segundo Dümichen *et al.* (2017) polímeros comercialmente disponíveis, utilizados para aplicações comuns de mercado mostram uma decomposição principal entre temperaturas de  $375$  e  $500^\circ C$ ,

ou seja, a temperatura utilizada durante o experimento não causou interferência nas partículas microplásticas.

Após o período de 48 horas, as duas amostras de plástico da bolsa e todas as amostras de precipitado foram consideradas como digeridas então foram processadas para, posteriormente, serem analisadas pelas técnicas de Raman e MEV/EDS, além de microscopia óptica para as amostras de precipitado. Os fragmentos da bolsa permaneceram armazenados, em temperatura ambiente, nos vidros de Penicilina aonde foram colocados inicialmente, já as amostras de precipitado, como apresentavam um material particulado sólido, foram solubilizadas com duas gotas de água ultrapura para formar um esfregaço em lâmina de vidro e então colocadas em estufa a 37°C para secar. Após a secagem as lâminas foram armazenadas em um laminário de madeira contendo sílica gel para evitar a exposição a umidade.

Como nenhuma das 15 amostras de sobrenante apresentou degradação do filtro de microfibras de vidro foi necessária a utilização do protocolo de dupla digestão com KOH nessas amostras. E também pelo fato do KOH apresentar bons resultados em estudos realizados conforme mencionado por Dehaut *et al.* (2016).

A adição do KOH 10% (p/p) foi realizada na proporção de 4 unidades de volume (mL) para 1 unidade de volume de amostra (mL). Por se tratar de uma mistura altamente reativa a incubação subsequente ocorreu em temperatura ambiente, segundo descrito por Carvalho *et al.* (2021). Após o período de incubação de 48 horas a digestão das amostras ainda não estava completa. Afim de realizar a extração de microplásticos livres de matéria orgânica optou-se por tentar um método de flotação por densidade, onde é utilizada uma solução saturada que favorece a flotação dos microplásticos, uma vez que são menos densos que os sedimentos segundo Pappis, Kapusta e Ojeda (2021).

Foi utilizado o Cloreto de zinco para a realização do método de flotação devido a sua disponibilidade, e para isso foi preparada uma solução de densidade igual a 1,6kg/L conforme citado por Rodrigues *et al.* (2020) e Imhof *et al.* (2012), sendo essa considerada a densidade mais efetiva para a realização desse procedimento de extração. Devido ao fato de algumas amostras terem reagido aos processos anteriores com KOH foi realizado o teste de flotação de modo piloto em 7 das 15 amostras de sobrenadante disponíveis. Foi utilizado um volume de 3 mL de solução em cada amostra, seguido de agitação. Após 24 horas foi retirada, com auxílio de pipetas de vidro, a película superficial localizada na parte superior da amostra e

colocada sobre lâminas de vidro na forma de esfregaço, as quais seguiram para secagem em estufa a 37°C. Após a secagem foram armazenadas em laminário juntamente com as lâminas de amostras de precipitado.

Após todas essas etapas as lâminas foram submetidas a triagem por microscopia óptica no mesmo laboratório que foram manipuladas, e posteriormente, encaminhadas ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, juntamente com os três fragmentos da bolsa, para serem realizadas as análises de Raman, MEV/EDS e FTIR.

#### 4.4 MICROSCOPIA ÓPTICA

Foi empregado microscopia de luz polarizada simples (*Olympus CX41*) para avaliar a presença de fragmentos com características visuais e físicas (por exemplo, forma, forma, cor, brilho, dureza, elasticidade) que estavam associados a materiais plásticos. O objetivo da microscopia óptica foi fazer uma pré-triagem, com o intuito de reduzir o número de partículas a ser analisadas, com base nas características já mencionadas. A varredura das lâminas foi realizada usando uma objetiva de 10x e caracterizada morfologicamente sob uma objetiva de 40x.

#### 4.5 RAMAN

A análise do Raman foi realizada antes da MEV/EDS para evitar o comprometimento das amostras. Foi realizada a técnica de  $\mu$ -Raman. As análises foram realizadas pelo espectrômetro *Xplora Plus*, da marca *Horiba*, com um laser de 785 nm, com microscopia confocal e objetiva 50x, a intensidade e o tempo de exposição (em média 20 segundos) ao laser foi sendo adaptada para que não houvesse queimaduras nas amostras durante a análise e as grades de difração de 600 linhas por mm. Os fragmentos de plástico da bolsa foram submetidos a análise direta do material, já as lâminas de microplásticos foram anexados ao microscópio cobertas por fita adesiva dupla face. Todos os espectros foram avaliados em um intervalo de 50–3.500  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros obtidos foram processados usando o software “*Spectragryph - optical spectroscopy*” (Dr. Friedrich Menges), versão 1.2, 2020, obtido através de <https://www.effemm2.de/spectragryph/index.html>. Os

resultados foram comparadas usando uma biblioteca espectral desenvolvida para pesquisa em microplásticos (Biblioteca Espectral SloPP\_Raman\_microplastics\_276entries), compilada da biblioteca criada por *Rochman Lab – University of Toronto*, através do site [https://www.ffmpeg2.de/spectragryph/down\\_databases.html](https://www.ffmpeg2.de/spectragryph/down_databases.html), onde foi obtida.

#### 4.6 FTIR

Apenas um fragmento grande de plástico da bolsa foi utilizado para análise do FTIR, os outros dois foram utilizados nas análises de Raman e MEV/EDS. Foi utilizado o pedaço que não sofreu processo de digestão, uma vez que esse fragmento não teve contato nenhum com o concentrado plaquetário. Esse material foi usado para fazer a caracterização da bolsa e a ausência de matéria orgânica auxilia a obter um espectro mais limpo. O equipamento *IRPrestige-21* com acessório de refletância difusa, *DRS-8000* da marca *Shimadzu* foi utilizado. Os espectros obtido foi processado usando o software “*Spectragryph - optical spectroscopy*” (Dr. Friedrich Menges), versão 1.2, 2020, obtido através de <https://www.ffmpeg2.de/spectragryph/index.html>. Os resultados foram comparadas usando uma biblioteca espectral desenvolvida para pesquisa em microplásticos, contendo principalmente amostras de referência. Essa biblioteca foi compilada a partir do depositário de dados espectrais do artigo: S. Primpke, M. Wirth, C. Lorenz, G. Gerdt: “*Reference database design for the automated analysis of microplastic samples based on Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410, 5131–5141 (2018), recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-018-1156-x>. Aprimorado com 57 espectros FTIR de plásticos do artigo: Q.T. Birch, P.M. Potter, P.X. Pinto, D. D. Dionysiou, S.R. Al-Abed: “*Isotope ratio mass spectrometry and spectroscopic techniques for microplastics characterization*”, o qual obtido através de: <https://edg.epa.gov/metadata/catalog/search/resource/details.page?uuid=%7BC4F157A8-5F25-4704-A10D-0F02CF869CE6%7D>. A biblioteca foi obtida através do site [https://www.ffmpeg2.de/spectragryph/down\\_databases.html](https://www.ffmpeg2.de/spectragryph/down_databases.html).

#### 4.7 MEV/ EDS

Para que fosse realizada a análises das fibras presentes nas lâminas por microscopia eletrônica as amostras precisaram passar por etapas preliminares, onde foram fixadas em suportes metálicos (*stubs*) utilizando uma fita de dupla face de cobre. Não foi utilizada a fita de carbono pois poderia causar interferência com o material analisado, devido ao fato de materiais plásticos possuírem grandes quantidades de carbono em sua composição. A fita dupla face foi aderida ao *stub* com o auxílio de pinças metálicas, e então o *stub* foi utilizado como um carimbo para aderir as partículas a fita de cobre após o contato direto com a lâmina. A localização das partículas foi realizada com o auxílio do microscópio óptico.

Os materiais para serem avaliados através do uso dessa metodologia precisam ser bons condutores, característica necessária para que haja a formação da imagem, então as amostras passaram por um processo de pulverização (*sputtering*) com ouro em pó, para que ocorresse a deposição de íons metálicos nelas, formando uma película. Outra característica importante é a ausência de umidade nas amostras, uma vez que a umidade pode causar problemas na produção de imagem, para isso foi usada a sílica-gel (COSTA, 2016; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Para análises dos fragmentos plásticos da bolsa não foram necessários preparos adicionais pré-analíticos, apenas a pulverização com partículas de ouro.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada utilizando o microscópio Mira 3 da marca Tescan. Ele possui varredura por emissão de campo (FEG) e possui detectores de EDS (detectores por energia dispersiva), então foi possível realizar a caracterização química das estruturas analisadas, gerando espectros com elementos químicos presentes nas amostras e suas porcentagens.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados e organizados utilizando o software Microsoft Excel® 2016, onde também foram feitos os gráficos, médias e desvios padrões. As demais análises estatísticas, como o teste de Teste de Shapiro-Wilk (para avaliar a normalidade dos dados) e a Correlação de Pearson foram feitos através do *software* de computador Jamovi (Versão 2.2). Obtido através de <https://www.jamovi.org>.

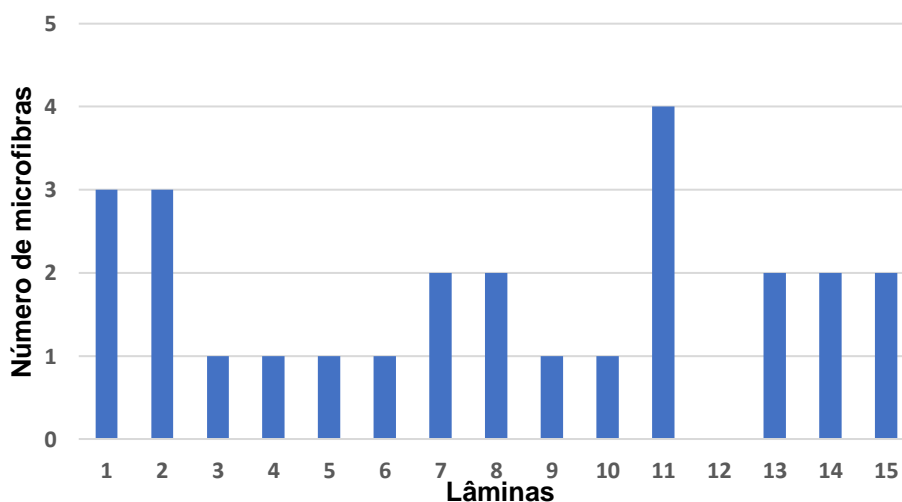
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

Através da microscopia óptica, foram visualizadas um total de 26 estruturas (Gráfico 1) com características físicas e visuais que estavam associados a materiais plásticos nas 15 lâminas analisadas de amostras de precipitado. Apenas na amostra de número 12 não foi visualizado nenhum material. Todas as estruturas visualizadas foram caracterizadas como fibras, sendo que das 26 visualizadas, vinte e quatro (92%) delas eram azul esverdeadas (Figura 3) e duas (8%) preto acinzentadas.

Nas amostras de sobrenadante foram encontradas apenas 3 fibras em 7 das lâminas analisadas(piloto). A menor quantidade de fibras encontradas nas lâminas de sobrenadante reflete que o processo de centrifugação realizado no início do processamento do concentrado de plaquetas foi importante para concentrar melhor as partículas, que provavelmente são mais densos que a solução de plasma, que é composto em boa parte por água. Devido a uma menor quantidade de estruturas encontradas, optou-se por não prosseguir com as análises das amostras de sobrenadante.

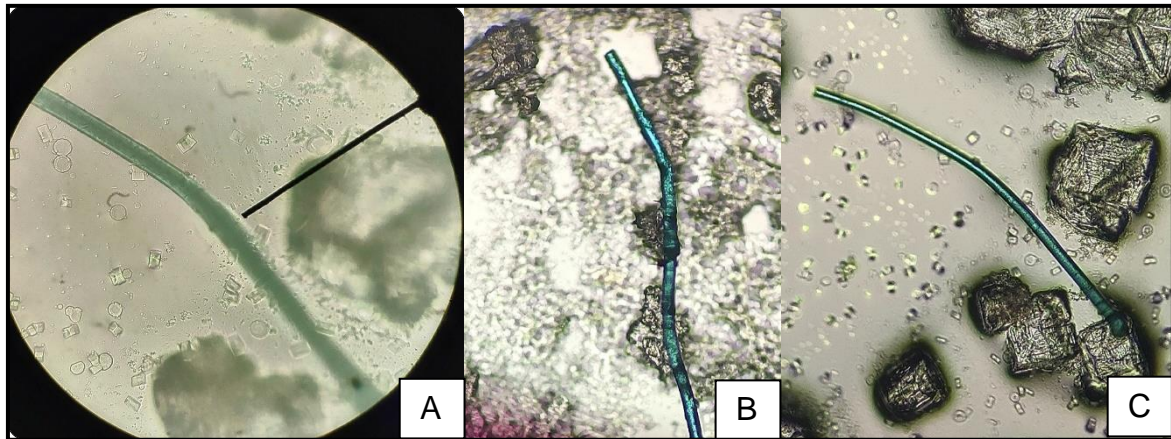
GRÁFICO 1 – Número de microfibras encontradas em cada lâmina.



Fonte: A autora, 2022.



Figura 3 - Fibra visualizada através de microscopia óptica na amostra 2A.



Legenda: (A). Aumento de 40x. (B). Aumento de 10x. (C). Aumento de 4x.  
Fonte: A autora,2022.

Foi realizada também a média dos volumes de amostra encontrados nas bolsas, que foi de 65,2 mL, com um desvio padrão foi de 1,3. Afim avaliar se existia ou não uma correlação entre o número de fibras encontradas com o volume de amostra presente na bolsa foi realizado um teste paramétrico, após constatar a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk ( $p > 0.05$ ), conforme mostra a Figura 4.

Figura 4 - Teste de Shaapiro Wilk

Descriptives		
	Volume (mL)	Quantidade de fibras encontradas
N	15	15
Mean	65.2	1.73
Standard deviation	1.26	1.03
Shapiro-Wilk W	0.918	0.904
Shapiro-Wilk p	0.179	0.110

Fonte: A autora,2022.

Então foi realizada a correlação de Pearson (Figura 5). O valor de  $r$  obtido (-0.120) com valor de  $p=0.669$  demonstrou que não existem correlação entre o volume de amostras e a quantidade de fibras encontradas (Figura 6).

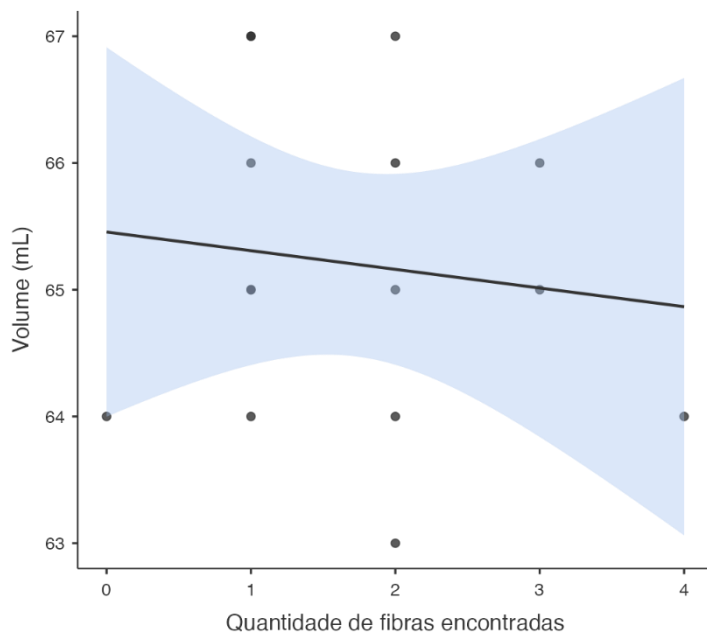
Figura 5 - Teste de correlação de Pearson (valores)

Correlation		Quantidade de fibras encontradas	Volume (mL)
Quantidade de fibras encontradas	Pearson's r	—	—
	p-value	—	—
	N	—	—
Volume (mL)	Pearson's r	-0.120	—
	p-value	0.669	—
	N	15	—

Note. \*  $p < .05$ , \*\*  $p < .01$ , \*\*\*  $p < .001$

Fonte: A autora,2022.

Figura 6 - Teste de correlação de Pearson (gráfico)



Fonte: A autora,2022.

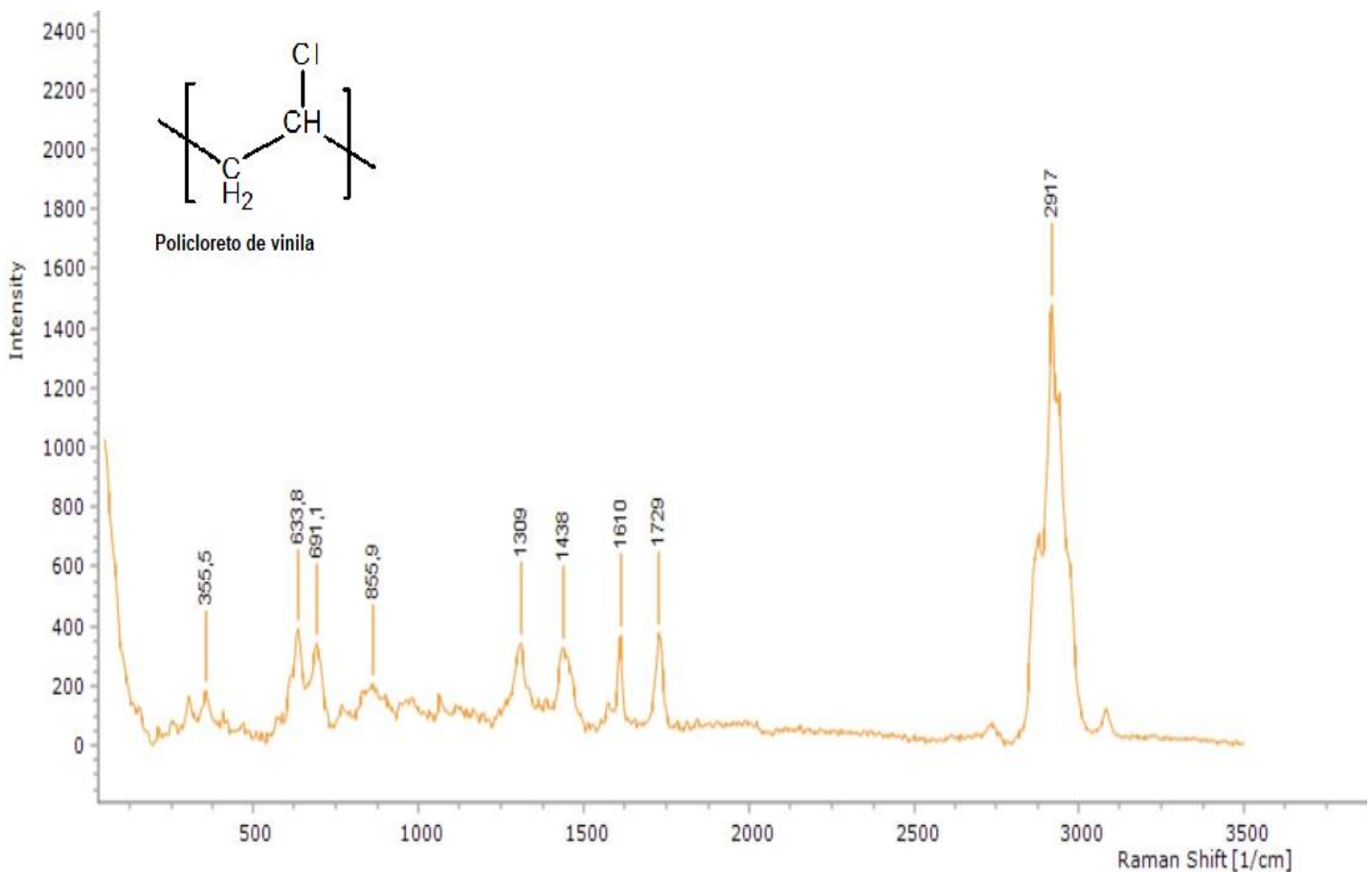
Também foi realizada a análise das placas utilizadas como controle durante o processamento das amostras, o qual foi realizado em duas etapas. Nas placas de controle do fluxo laminar foram encontradas em média 2 fibras ( $\sigma = 1$ ) por placa, já nas placas de controle de ambiente a média foi de 1,5 fibras ( $\sigma = 0,5$ ) por placa. Nas placas de controle da estufa não foram encontradas estruturas. Os valores encontrados são

considerados aceitáveis levando em consideração o fato de o laboratório de análises ser utilizado para outras atividades durante esse período.

## 5.2 RAMAN

A primeira análise de Raman realizada foi a caracterização do material da bolsa. Dois fragmentos foram retirados para análise, ambos obtiveram espectros bastante similares entre si, obtendo compatibilidade maior para o Policloreto de vinila (PVC) com taxas superiores a 90%. Schwabl *et al.* (2019) usaram como critério em seu estudo a identificação com base em espectros que apresentassem similaridade com microplásticos de referência superior a 70%. A figura 7 representa o espectro obtido do material plástico encontrado próximos aos conectores da bolsa, enquanto a figura 8 representa o resultado de compatibilidade do espectro utilizando a biblioteca.

Figura 7 - Espectro obtido do fragmento plástico da bolsa



Fonte: A autora, 2022.

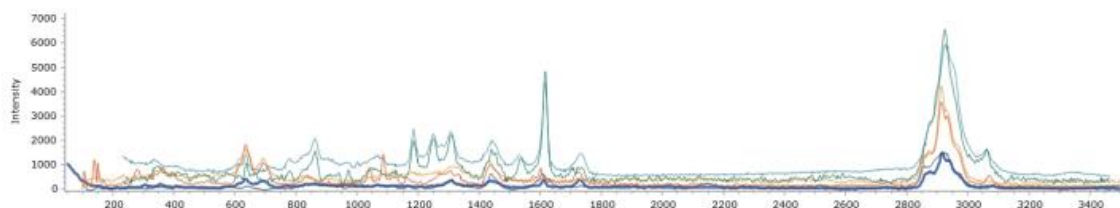
Figura 8 - Resultado de compatibilidade do espectro com a biblioteca.

**Best hit:**

16 638nm\_01.txt : Reference ID Polyvinyl Chloride 5 (93,34%)

spectrum info				search & results		descriptor rating			
sample ID	ref. ID	name	method	search name	rating	Polymer	Laser wl	colour	weathered
16 638nm	--		Raman	Search1	93,3				
	Polyvinyl	Polyvinyl Chloride			93,34	Polyvinylchloride	532	Clear	No
	Polyvinyl	Polyvinyl Chloride			93,28	Polyvinylchloride	532	Grey	No
	Polyurethane 6	Polyurethane 6.			88,70	Polyurethane	532	Black	No
	Polyurethane 3	Polyurethane 3.			88,38	Polyurethane	532	White	Yes
	Polyurethane	Polyurethane 11.			88,37	Polyurethane	532	Grey	No

**Sample spectrum plot (+hits):**



Fonte: A autora, 2022.

Dentre as 26 fibras encontradas nas amostras de precipitado, a maioria não obteve compatibilidade com materiais polímeros, foram encontradas fibras de *cotton* (algodão) em sua maior proporção e fibras de celulose. Foram encontradas 4 fibras de poliéster (2 amostras), 9 de polietileno (5 amostras) e 4 de poliamida (2 amostras). Foram encontradas baixas proporções de compatibilidade, sendo de  $16,9 \pm 3,3$  para poliéster,  $34,6 \pm 13,9$  para polietileno e  $46,6 \pm 7,4$  para poliamida.

Embora o uso de bibliotecas seja uma maneira ágil e prática, além de uma das maneiras mais utilizadas para identificação de microplásticos, a probabilidade de uma correspondência bem-sucedida empregando o software de correspondência de biblioteca depende muito da abrangência da biblioteca espectral. Existem bibliotecas personalizadas, que geralmente dependem de espectros adquiridos de *pellets* de polímeros puros e bibliotecas comerciais que dependem de espectros adquiridos de polímeros comercializados (obtidos de fornecedores), que incluem em sua composição uma variedade de aditivos, cargas e agentes corantes, os quais podem, em alguns casos, se sobrepor ou até mesmo mascarar o espectro do polímero subjacente (ARAUJO *et al.*, 2018).

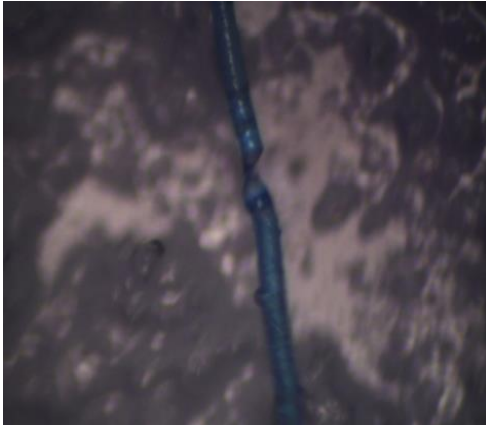
Neste estudo foi utilizada uma biblioteca contendo uma coleção de espectros de Raman de microplásticos obtidos a partir de amostras puras e amostras expostas ao processo de intemperização (ambientais), uma vez que os materiais plásticos da

bolsa tratam – se de polímeros comerciais, entretanto não podia se saber a origem das fibras encontradas no concentrado plaquetário. O uso de bibliotecas comerciais mais abrangentes é o ideal no que se trata de amostras ambientais já que os microplásticos ambientais resultam principalmente da fragmentação de polímeros comerciais disponíveis em diferentes morfologias, porém uma das limitações dessas bibliotecas se deve ao fato de que elas incluem apenas espectros de plásticos que não foram expostos à degradação ambiental, mais uma vez dificultando a probabilidade de correspondências bem-sucedidas (ARAUJO *et al.*, 2018).

Visto que as fibras analisadas foram triadas por meio de características físicas compatíveis com materiais polímeros em microscopia óptica e posteriormente tiveram sua composição analisada por meio de MEV/EDS, onde obteve-se resultado compatível com a composição de materiais polímeros, pode-se concluir que tratam-se de fibras altamente sugestivas de serem de microplásticos conforme também concluíram Wang *et al.*(2017) em seu estudo de caracterização de microplásticos obtidos do oceanos e de conteúdo estomacal de peixes de laboratório e peixes oceânicos. Entretanto não se consegue obter a origem das mesmas, dado que elas podem ser provenientes do material plástico da bolsa ou do doador, para isso seria necessária a obtenção de espectros que apresentassem uma melhor compatibilidade com as amostras da biblioteca utilizada.

As fibras analisadas também podem ser provenientes do meio ambiente, chegando ao ser humano pelas vias de exposição anteriormente comentadas ou podem ser fruto de contaminação durante o processo de análise, embora todas as medidas cabíveis tenham sido tomadas para evitar inconsistência nas análises. Dentre os fatores que podem ter prejudicado a obtenção de espectros compatíveis temos a presença de aditivos e corantes presentes em amostras de microplásticos e também material orgânico não degradado, que são capazes de gerar espectros anormais ou até mesmo cobrir o sinal remetendo a incompatibilidade frente a biblioteca utilizada. Esses fatores também enfraquecem o sinal do laser, necessitando que seja estendido o tempo de integração, resultando em maior tempo de medição, que no pior das hipóteses resulta em degradação da amostra induzida pelo laser conforme observado na Figura 9 (ARAUJO *et al.*, 2018; SCHMID; COZZARINI; ZAMBELLO, 2021).

Figura 9 - Fibra danificada pela ação do laser do Raman.

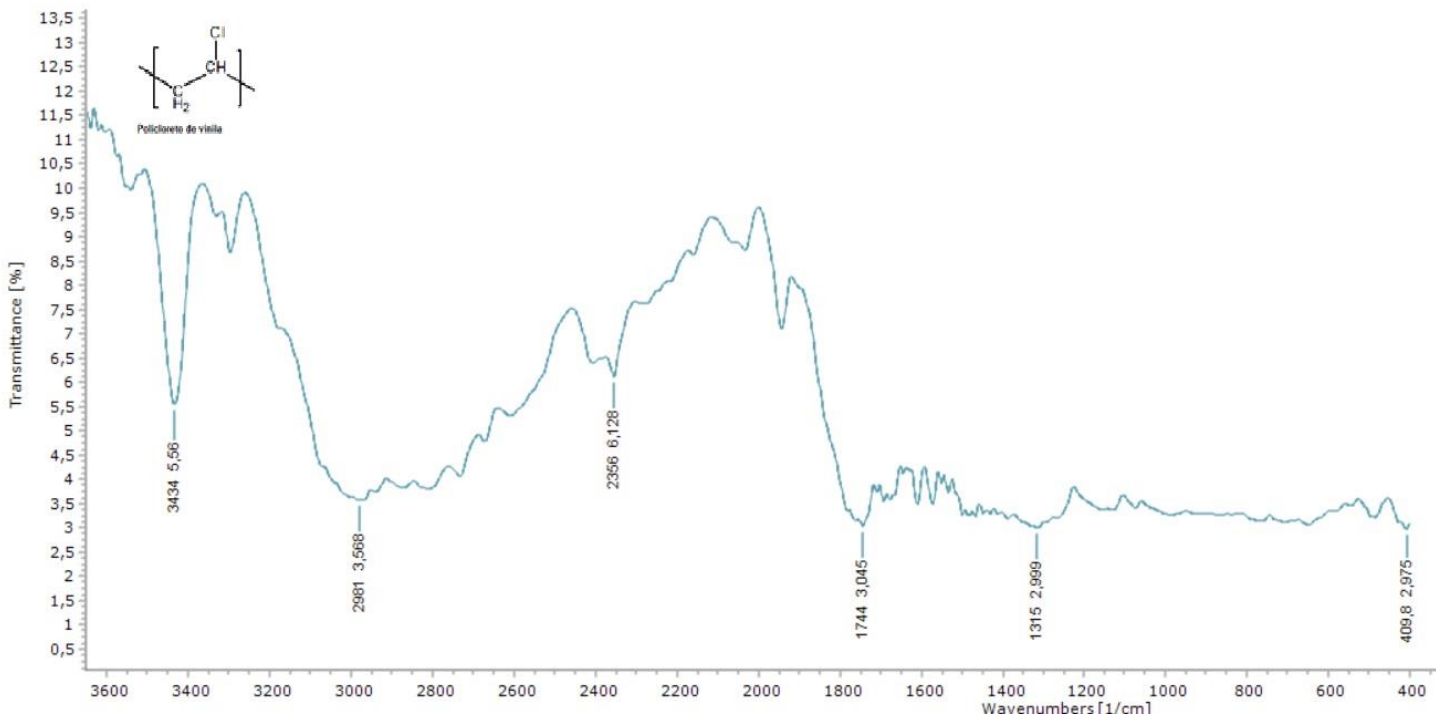


Fonte: A autora, 2022.

### 5.3 FTIR

A análise do FTIR foi realizada somente na amostra de plástico da bolsa, uma vez que para análise de materiais menores seria necessária a utilização da técnica de  $\mu$ -FTIR, a qual não está disponível nas dependências da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O seguinte espectro obtido pode ser observado na figura 10.

Figura 10 - Espectro obtido da análise de fragmento da bolsa de PVC.



Fonte: A autora, 2022.

A probabilidade de uma correspondência bem-sucedida empregando o software de correspondência de biblioteca, assim como o Raman, também depende muito da abrangência da biblioteca espectral utilizada. A biblioteca disponível utilizada apresentava amostras de plásticos de referência, ou seja, plásticos puros. Esse fato pode ter interferido na obtenção de uma melhor correspondência, uma vez que a amostra utilizada em questão era um plástico comercial contendo aditivos e ainda foi submetida a um leve intemperismo após a produção dos concentrados plaquetários, sendo exposta a refrigeração e a agitação constante, fatores que garantem a estabilidade do concentrado de plaquetas. O resultado obtido pode ser observado na figura 4, onde se observa a correspondência com alguns outros materiais, plásticos ou naturais, e também com o PVC, em uma proporção de 64,2%. Contudo, o mesmo material foi submetido a análise através de outras técnicas, como Raman e MEV/EDS, o que pode garantir uma melhor caracterização do material como Policloreto de vinila.

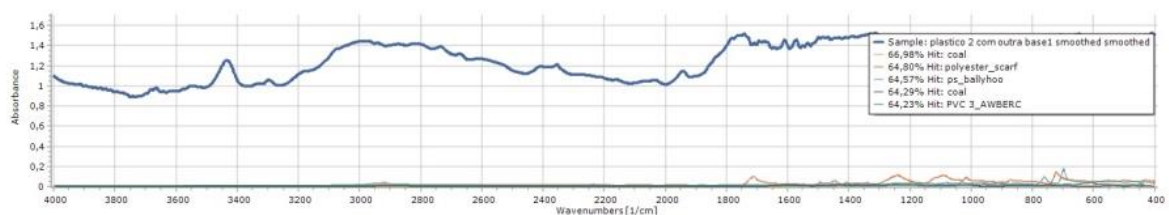
Figura 11 - Resultado de compatibilidade do espectro FTIR encontrado.

#### Best hit:

plastico 2 com outra base1.txt : Reference ID Pimpke 329 (66,98%)

spectrum info				search & results		descriptor rating		
sample ID	ref. ID	name	method	search name	rating	Natural/Synth	Plastic/Other	Class
plastico	--	plastico 2 com	FTIR	Search1	67,0			
	Pimpke 329	coal	FTIR		66,98	natural	natural	other
	Birch19	polyester_scarf			64,80	synthetic	plastic	PET
	Birch48	ps_ballyhoo			64,57	synthetic	plastic	PS - Polystyrole
	Pimpke 332	coal	FTIR		64,29	natural	natural	other
	Birch54	PVC_3_AWBERC			64,23	synthetic	plastic	PVC

#### Sample spectrum plot (+hits):



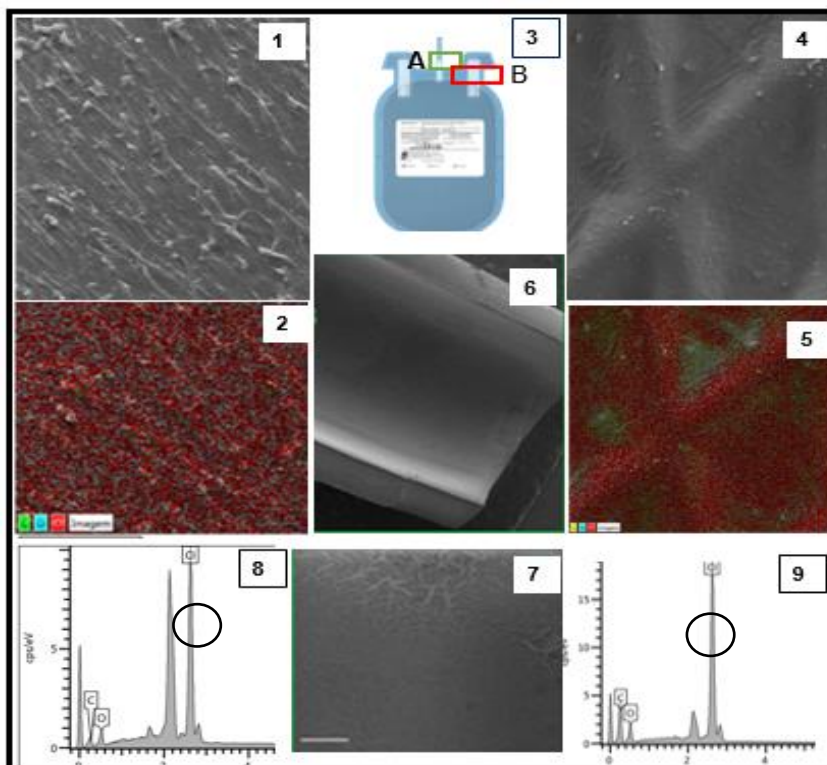
Fonte: A autora,2022.

## 5.4 MEV/EDS

As primeiras amostras analisadas por microscopia eletrônica de varredura acoplada ao EDS/SEM foram as amostras de material da bolsa. Foi analisado um fragmento do tubo e também um fragmento do plástico que envolvia os conectores.

Ambos os pedaços apresentam espectro contendo Carbono, Oxigênio e Cloro. Segundo Wang *et al.* (2017) partículas de Policloreto de vinil (PVC) de referência demonstraram características únicas, como intensidade relativamente brilhante do detector de elétrons retroespalhado, superfícies relativamente lisas e irregulares, e fortes picos de cloro (Cl) nos espectros de EDS (Figura 5). Essas características foram usadas para validar a identidade do polímero, uma vez que, segundo informações do próprio fabricante, trata-se de PVC.

Figura 12 - Resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos da bolsa.



Legenda: (1) Superfície externa do tubo; (2) Mapeamento por EDS da superfície externa do tubo; (3) Representação dos fragmentos analisados, sendo A o tubo e B o fragmento próximo ao conector; (4) Parte externa do fragmento próximo ao conector; (5) Mapeamento por EDS do fragmento externo próximo ao conector; (6) Superfície interna do tubo; (7) Superfície interna do tubo com maior ampliação, demonstrando ranhuras; (8) e (9) Espectros referentes as duas amostras analisadas, demonstrando altos picos de Cloro característicos de PVC.

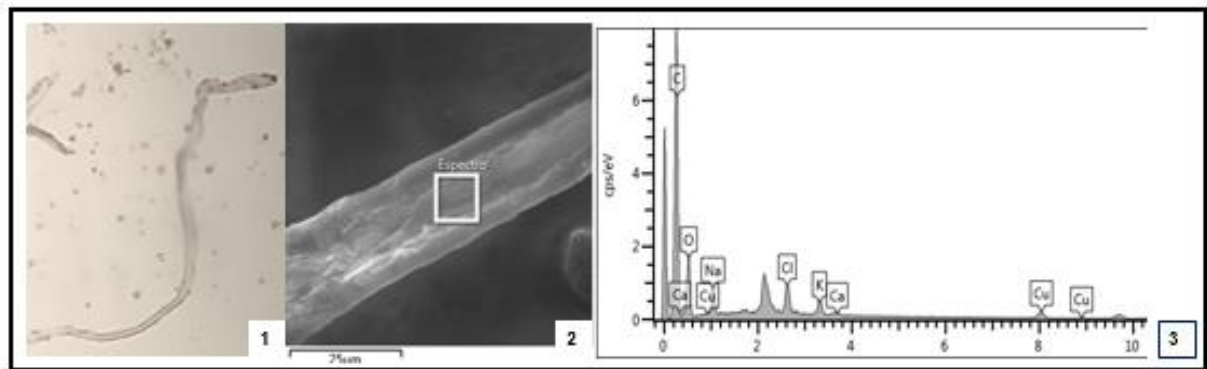
Fonte: A autora, 2022.

As análises de MEV/EDS foram realizadas em 13 amostras, sendo que a amostra 12 não continha estruturas e a amostra 8 apresentou muito resíduo de matéria orgânica impossibilitando a análise. Os resultados das análises demonstraram a presença de 13 elementos: Carbono (C), oxigênio (O), sódio (Na), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca), cobre (Cu), titânio (Ti), índio (In), silício (Si), enxofre (S),



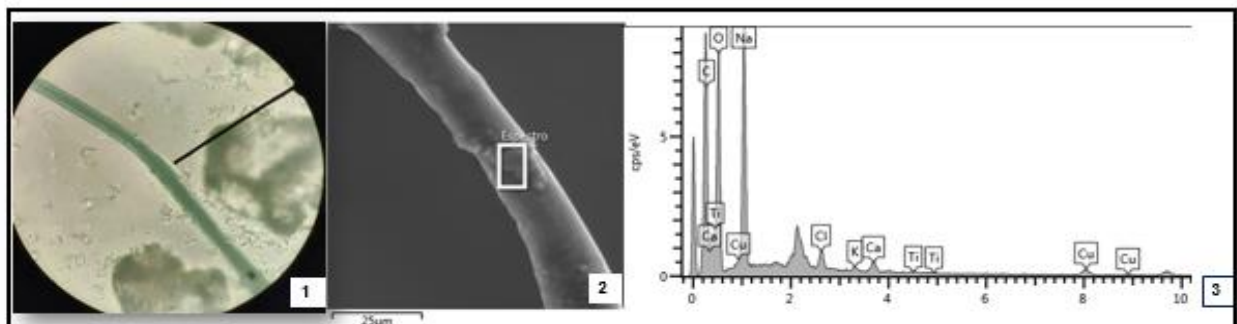
fósforo (P) e nitrogênio (N). Nas figuras 13 e 14 encontramos os resultados encontrados na categorização da amostra por EDS, como sua visualização através da microscopia óptica das amostras 2 e 3.

Figura 13 - Microscopia óptica e microscopia eletrônica com EDS da amostra 1.



Legenda: (1) Fibra visualizada na microscopia óptica; (2) Fibra visualizada na microscopia eletrônica de varredura em escala de 25 μm. (3) Espectro contendo os elementos químicos presentes na fibra. Fonte: A autora,2022.

Figura 14 - Microscopia óptica e microscopia eletrônica com EDS da amostra 2.



Legenda: (1) Fibra visualizada na microscopia óptica; (2) Fibra visualizada na microscopia eletrônica de varredura em escala de 25 μm. (3) Espectro contendo os elementos químicos presentes na fibra. Fonte: A autora,2022.

O elemento carbono não estava presente em apenas uma das amostras analisadas, o que descarta a possibilidade de se tratar de um material plástico já que o carbono é um dos elementos centrais presente na maioria dos materiais poliméricos assim como o oxigênio (GIRÃO *et al.*, 2020). O elemento oxigênio foi detectado em todas as amostras. Carbono e oxigênio apareceram sempre em maiores proporções dentro todos os elementos caracterizados, com um percentual das médias de 39% para o carbono e de 33% para o oxigênio, seguidos de potássio, sódio, cloro, respectivamente. O elemento Cu foi desconsiderado das análises devido ao fato de

ser o material utilizado na confecção da fita dupla face aplicada aos *stubs*, já o alumínio que compõe os *stubs* não interferiu em nenhuma amostra.

Os elementos que estão contidos em maior quantidade nas amostras são mais precisamente identificados, de maneira mais fácil, enquanto elementos presentes em pequenas quantidades podem sofrer alguma interferência da técnica alterando o resultado final, por isso torna – se adequado considerar que elementos presentes com valor inferior a 1% representam traços do elemento na amostra (COSTA, 2016). Foi o caso do elemento cálcio que apareceu em cinco das amostras, e do titânio presente em apenas uma, ambos com um percentual inferior a 1%, o que pode caracterizar interferência na análise ou contaminantes na amostra. Embora carbonato de cálcio esteja presente na estrutura de alguns materiais plásticos para melhorar sua estrutura e titânio seja encontrado em pigmentos feito de óxidos de titânio, a porcentagem desses elementos deveria ser muito maior do que o encontrado para serem caracterizados como aditivos de plásticos (WANG *et al.*, 2017).

Os outros elementos apareceram com percentuais baixos, porém acima de 1%. Sódio, cloro e potássio são íons abundantes no plasma sanguíneo e podem ter interferido nas análises caso não tenham sido degradados corretamente no protocolo de digestão. O cloro pode caracterizar PVC, porém para que isso aconteça deve ser encontrado em porcentagens maiores.

O nitrogênio e o fósforo são utilizados no processo de fabricação de alguns materiais plásticos, ajudando a evitar a descoloração e a oxidação durante o processo de fabricação e como retardador de chama, respectivamente. O nitrogênio foi encontrado em duas amostras com percentual altos de 10,44% e 10,75%. Já o fósforo apareceu em duas amostras com percentual de 2,68% e um percentual muito pequeno de 0,37% que possivelmente caracteriza contaminação.

Índio, silício, enxofre não são elementos conhecidos por apresentarem correlação com materiais plásticos então podem ter sido adsorvidos por materiais plásticos pelo meio, uma vez que os plásticos possuem uma característica de carrearem consigo poluentes, além da possibilidade de que esses materiais possam agir como contaminantes.

Apesar do equipamento utilizado ter alguns padrões para a realização das análises, mesmo assim existem algumas dificuldades, pois existem muitos outros parâmetros (fora aqueles ligados ao material) que fazem a superfície dos picos variar como: a) tensão de aceleração; b) natureza dos outros elementos presentes com os

quais se faz a quantificação: as raias de um elemento podem ser mais ou menos absorvidos pelos outros elementos que estão presentes no volume analisado e também a geometria da superfície analisada, sendo que os programas de cálculo quantitativo tendem a serem elaborados para superfícies planas e polidas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Todos esses fatores podem vir a influenciar na análise das amostras, além dos relacionados ao material, conforme comentado acima.

O uso combinado de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura mais espectroscopia de raios X com dispersão de energia (SEM/EDS) permite que um grande número de partículas microplásticas sejam rastreadas mais rapidamente. A microscopia óptica distingue materiais plásticos de outros compostos e o SEM/EDS fornece imagens de alta resolução e assinaturas de composição elementar, o que ajuda a descartar não plásticos, uma vez que fornece principalmente um espectro quantitativo com sinais elementares de carbono e oxigênio que são os elementos centrais presentes na maioria dos materiais poliméricos. No entanto, fora o PVC, que se distingue por apresentar fortes picos de Cloro em seu espectro, outras partículas de plástico, como polipropileno e polietileno não têm nenhum pico EDS distinto além de um forte pico de carbono, por isso torna-se necessário combinar o EDS com técnicas espectroscópicas como FTIR e Raman, uma vez que permite ainda a identificação química, gerando um espectro de impressão da amostra, podendo se saber qual o polímero e sua origem (GIRÃO *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2017).

## 6 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi detectada a presença de fibras altamente sugestivas de microplásticos em bolsas de concentrados de plaquetas, segundo a caracterização química e visual por MEV/EDS. A caracterização química do material plástico usado para o armazenamento das plaquetas resultou em Policloreto de vinila (PVC), um polímero constituído basicamente de carbono, oxigênio e cloro, enquanto os resultados das análises das fibras encontradas no concentrado de plaquetas não demonstraram altos picos de cloro característicos durante a análise por EDS/SEM, portanto, tratam-se de outros polímeros que não o material da bolsa. Uma vez que todos os cuidados cabíveis foram tomados durante as análises afim de evitar contaminantes, acredita-se que os materiais encontrados estavam presentes no concentrado, porém sabe-se que mais estudos devem ser realizados, com um

número maior de amostras e análises de hemocomponentes que ficam armazenados em materiais plásticos durante um maior tempo para garantir que não há degradação da embalagem utilizada, culminando na exposição aos microplásticos. Também são necessárias adaptações nos protocolos de processamento das mesmas, afim de obter como resultado um material livre resíduos de orgânicos para as análises de Raman.

## REFERÊNCIAS

ABBASI, Sajjad; TURNER, Andrew. Human exposure to microplastics: a study in iran. **Journal of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 403, p. 123799, fev. 2021.

ABSHER, Theresinha Monteiro *et al.* Incidence and identification of microfibers in ocean waters in Admiralty Bay, Antarctica. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 292-298, nov. 2018.

AMATO-LOURENÇO, Luís Fernando *et al.* Presence of airborne microplastics in human lung tissue. **Journal of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 416, p. 126-124, ago. 2021.

ARAUJO, Catarina F. *et al.* Identification of microplastics using Raman spectroscopy: latest developments and future prospects. **Water Research**, [S.L.], v. 142, p. 426-440, out. 2018.

AYARS, E.J. *et al.* Fundamental differences between micro- and nano Raman spectroscopy. **Journal of Microscopy**, [S.L.], v.202, 142-7, abr. 2001.

BANAEE, Mahdi *et al.* Effects of microplastic exposure on the blood biochemical parameters in the pond turtle (*Emys orbicularis*). **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 28, n. 8, p. 9221-9234, nov. 2020.

BARRETO, Matheus de Faria e Oliveira. **Caracterização micro-nanoestrutural e química de argamassas de cimento Portland**. 2014. 220 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia, Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BLACKBURN, Kirsty; GREEN, Dannielle. The potential effects of microplastics on human health: what is known and what is unknown. **Ambio**, [S.L.], v. 51, n. 3, p. 518-530, jun. 2021.

BRASIL, Ministério da saúde. Departamento de atenção especializada e temática. **Guia para uso de hemocomponentes**, 2. ed., 1 reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 136 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 158, de 4 de fevereiro de 2016. Brasília, 2016.

CAMPANALE *et al.* A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.L.], v. 17, n. 4, p.1212-1238, fev. 2020.

CARVALHO, Aline Reis de *et al.* Protocol for microplastic pollution monitoring in freshwater ecosystems: towards a high-throughput sample processing - microplastream. **Methodsx**, [S.L.], v.769, n. 8, maio 2021.

ÇOBANOĞLU, Hayal *et al.* Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes. **Chemosphere**, [S.L.], v. 272, p. 129805, jun. 2021.

COSTA, Fernanda Rodrigues Torres da. Microscopia eletrônica de varredura: potencialidades e aplicações. 2016. 51 f. **TCC** (Graduação) - Curso de Química Industrial, Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.** Porto Alegre: Edipucrs, 2007. 60 p.

DEHAUT, Alexandre *et al.* Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 215, p. 223-233, ago. 2016.

DE-LA-TORRE, Gabriel Enrique. Microplastics: an emerging threat to food security and human health. **Journal of Food Science and Technology**, [S.L.], v. 57, n. 5, p. 1601-1608, out. 2019.

DENG, Yongfeng *et al.* Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n.1, abr. 2017.

DÜMICHEN, Erik *et al.* Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. **Chemosphere**, [S.L.], v. 174, p. 572-584, maio 2017.

FACCIOLÀ, Alessio *et al.* Newly Emerging Airborne Pollutants: current knowledge of health impact of micro and nanoplastics. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.L.], v. 18, n. 6, mar. 2021.

FALCO, Francesca de *et al.* The contribution of washing processes of synthetic clothes to microplastic pollution. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, abr. 2019.

FERRARI, Tatiane Caroline *et al.* Microscopia eletrônica aplicada em nanomateriais: catalisador sol-gel cuo/zno/al<sub>2</sub>o<sub>3</sub>. **Brazilian Applied Science Review**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 2718-2738, nov. /dez. 2019.

GASPERI, Johnny *et al.* Microplastics in air: are we breathing it in?. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, [S.L.], v. 1, p. 1-5, fev. 2018. Elsevier BV.

GIRÃO, Ana Violeta *et al.* SEM/EDS and Optical Microscopy Analysis of Microplastics. **Handbook of Microplastics in the Environment**, [S.L.], p. 1-22, jun. 2020.

GORI, Tommaso; MÜNDEL, Thomas. Oxidative stress and endothelial dysfunction: therapeutic implications. **Annals of Medicine**, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 259-272, fev. 2011.

HIDALGO-RUZ, Valeria *et al.* Microplastics in the Marine Environment: a review of the methods used for identification and quantification. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 46, n. 6, p. 3060-3075, mar. 2012.

IMHOF, Hannes K. *et al.* A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. **Limnology and Oceanography: Methods**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 524-537, jul. 2012.

KÄPPLER, Andrea *et al.* Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: ftir, raman or both?. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 408, n. 29, p. 8377-8391, out. 2016.

KENTIN, Esther *et al.* Banning Microplastics in Cosmetic Products in Europe: legal challenges. **Springer Water**, [S.L.], p. 245-250, dez. 2017.

KIRAN, Boda Ravi; KOPPERI, Harishankar; MOHAN, S. Venkata. Micro/nano-plastics occurrence, identification, risk analysis and mitigation: challenges and perspectives. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 169-203, jan. 2022.

LETT, Zachary *et al.* Environmental microplastic and nanoplastic: exposure routes and effects on coagulation and the cardiovascular system. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 291, dez. 2021.

LI, Boqing *et al.* Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. **Chemosphere**, [S.L.], v. 244, abr. 2020.

LI, Dunzhu *et al.* Microplastic release from the degradation of polypropylene feeding bottles during infant formula preparation. **Nature Food**, [S.L.], v. 1, n. 11, p. 746-754, out. 2020.

LIM, Xiaozhi *et al.* Microplastics are everywhere — but are they harmful? **Nature**, [S.L.], v. 593, n. 7857, p. 22-25, maio 2021.



LU, Yifeng *et al.* Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 50, n. 7, p. 4054-4060, mar. 2016.

MALISKA, Ana Maria. **Microscopia eletrônica de varredura**. Ana Maria Maliska. Disponível em: [http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV\\_Apostila.pdf](http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf). Acesso em: 22 nov. 2021.

MATHEW, Joscilin *et al.* Physiology, Blood Plasma. **National Library of Medicine (The National Center for Biotechnology Information)**, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/>. Acesso em: 02 fev. 2022.

MOHANKUMAR, Sheba M.J. *et al.* Particulate matter, oxidative stress and neurotoxicity. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 479-488, maio 2008.

NAPPER, Imogen Ellen; THOMPSON, Richard C. Plastic Debris in the Marine Environment: history and future challenges. **Global Challenges**, [S.L.], v. 4, n. 6, abr. 2020. Wiley.

NITROGEN gas for manufacturing molded plastics. Disponível em: <https://www.onsitegas.com/blog/nitrogen-gas-for-manufacturing-molded-plastics>. Acesso em: 1 abr. 2022.

PAN, Zhong *et al.* Microplastics in the Northwestern Pacific: abundance, distribution, and characteristics. **Science of the Total Environment**, [S.L.], v. 650, p. 1913-1922, fev. 2019.

PAPPIS, Thatiane; KAPUSTA, Simone Caterina; OJEDA, Telmo. Metodologia de extração de microplásticos associados a sedimentos de ambientes de água doce. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 749-756, ago. 2021.

PHOSPHORUS Flame Retardants. Disponível em: <https://www.chempoint.com/en-mx/industries/plastics/phosphorus-flame-retardants>. Acesso em: 2 de abr. de 2022.

POWELL, Jonathan J; THOREE, Vinay; PELE, Laetitia C. Dietary microparticles and their impact on tolerance and immune responsiveness of the gastrointestinal tract. **British Journal of Nutrition**, [S.L.], v. 98, n. 1, p. 59-63, out. 2007.

PRATA, Joana Correia *et al.* Environmental exposure to microplastics: an overview on possible human health effects. **Science of the Total Environment**, [S.L.], v. 702, fev. 2020.

PRECIPITATED Calcium Carbonate (PCC) is used as a mineral load to improve the rheology and mechanical resistance of the plastic. Disponível em: <https://www.calcinor.com/en/calcinor/plastics>. Acesso em: 1 abr. de 2022.

RADFORD, Freya *et al.* Developing a systematic method for extraction of microplastics in soils. **Analytical Methods**, [S.L.], v. 13, n. 14, p. 1695-1705, mar. 2021.

RAHMAN, Arifur *et al.* Potential human health risks due to environmental exposure to nano- and microplastics and knowledge gaps: a scoping review. **Science of the Total Environment**, [S.L.], v. 757, fev. 2021.

RAGUSA, Antonio *et al.* Plasticenta: first evidence of microplastics in human placenta. **Environment International**, [S.L.], v. 146, jan. 2021.

RIBEIRO, Francisca *et al.* Accumulation and fate of nano- and micro-plastics and associated contaminants in organisms. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, [S.L.], v.111, p. 139-147, fev. 2019.

RODRIGUES, M.O. *et al.* Improving cost-efficiency for MPs density separation by zinc chloride reuse. **Methodsx**, [S.L.], v. 7, 2020.

SCHMID, Chiara; COZZARINI, Luca; ZAMBELLO, Elena. Microplastic's story. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 162, jan. 2021.

SCHWABL, Philipp *et al.* Detection of Various Microplastics in Human Stool. **Annals of Internal Medicine**, [S.L.], v. 171, n. 7, p. 453-457, out. 2019.

SCHWAFERTS, Christian *et al.* Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 112, p. 52-65, mar. 2019.

SHARMA, Shivika; CHATTERJEE, Subhankar. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 24, n. 27, ago. 2017.

TOSTES, Maria Aparecida V. *et al.* Influência da coleta, da produção e da estocagem na qualidade dos concentrados de plaquetas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 367-373, out. 2008.

UNITED STATES. Mark E. Brecher. Aabb (ed.). Blood Transfusion Therapy: a physician's handbook. 8. ed. Bethesda: Mark E. Brecher., 2005. 931 p. (Technical manual).

WANG, Jun *et al.* Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*). **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 254, p. 113024, nov. 2019.

WANG, Zhong-Min *et al.* SEM/EDS and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts. **Science of the Total Environment**, [S.L.], v. 603-604, p. 616-626, dez. 2017.

WELLE, Frank; FRANZ, Roland. Microplastic in bottled natural mineral water – literature review and considerations on exposure and risk assessment. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [S.L.], v. 35, n. 12, p. 2482-2492, nov. 2018.

YONG, Cheryl; VALIYAVEETTIL, Suresh; TANG, Bor. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.L.], v. 17, n. 5, fev. 2020.

ZHANG, Qun *et al.* A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: direct human exposure. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 54, n. 7, p. 3740-3751, mar. 2020.