



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SAMANTA STINGHEN DE ABREU

MICROPLÁSTICOS NO LEITE DE CONSUMO NO BRASIL:  
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

---

Londrina  
2024

SAMANTA STINGHEN DE ABREU

MICROPLÁSTICOS NO LEITE DE CONSUMO NO BRASIL:  
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vanerli Beloti

Londrina  
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

A161m Abreu, Samanta Stingham de.  
Microplásticos no leite de consumo no Brasil : isolamento e caracterização / Samanta Stingham de Abreu. - Londrina, 2024.  
118 p. f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2024.  
Inclui bibliografia.

1. Microplásticos - Tese. 2. Leite fluido - Tese. 3. Vermelho do Nilo - Tese. 4. Raman - Tese. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 63

SAMANTA STINGHEN DE ABREU

MICROPLÁSTICOS NO LEITE DE CONSUMO NO BRASIL:  
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanerli Beloti  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Alexandre Urbano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman  
Universidade Federal de São Carlos -  
UFSCar

Londrina, 26 de fevereiro de 2024.

## AGRADECIMENTOS

Queridos amigos, familiares e todos os que compartilharam momentos durante a jornada de mestrado, gostaria de expressar minha mais profunda gratidão por todo o apoio e incentivo ao longo deste caminho desafiador. Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Vanerli Beloti, cuja sabedoria, orientação e apoio foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Agradeço a parceria, o carinho e a paciência ao longo de todo o projeto, ainda que estivéssemos fisicamente tão distantes!

Também gostaria de estender meus agradecimentos às equipes de laboratórios que generosamente compartilharam seu conhecimento e experiência, auxiliando no planejamento e na execução prática deste projeto. Sem a colaboração e o suporte desses profissionais talentosos, este trabalho não teria sido possível: obrigada equipes do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natalia Gonzaga, Técnico Laboratorial Ronaldo Tamanini, residentes e colegas da pós-graduação), do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (Prof. Dr. Alexandre Urbano e Técnica Laboratorial Aline Mercí), Laboratório de Espectroscopia (Prof. Dr. Henrique de Santana) e a todos da comunidade científica da Universidade Estadual de Londrina que tenham direta ou indiretamente colaborado com insumos e/ou conhecimentos técnicos.

À banca avaliadora, pelas importantes pontuações durante a banca de qualificação, e dessa vez gostaria de agradecer especialmente ao Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman pela disponibilidade em participar da defesa do projeto em meio a tantos compromissos. Além disso, aproveito para agradecer ao professor Walter pelas contribuições prestadas desde o início, com *insights* valiosos decorrentes de sua vasta experiência na área. Ainda bem que encontrei a oferta da sua disciplina de Microplásticos no LinkedIn, isso fez toda a diferença no processo!

Não posso deixar de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de mestrado, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva do Leite (INCT/Leite) que financiaram este projeto.

Por fim, a parte essencial que me fortaleceu e incentivou muito em cada etapa da vida, agradeço de todo coração aos meus amados familiares (especialmente aos

meus pais que viabilizaram o caminho desde a infância para que eu chegasse até aqui, alcançando tal título de tamanho privilégio), meu companheiro e parceiro que faz parte da minha vida há quase uma década (Gabriel, não tenho mais palavras para agradecer tanto amor e cuidado), minha sogra maravilhosa (Meire, nossa relação sempre foi excepcional e me faltam palavras para agradecer todo o seu cuidado, carinho e parceria, e por ter aberto as portas de sua casa durante todos esses anos), e aos amigos, que estiveram ao meu lado em cada etapa deste percurso, oferecendo amor, risadas, apoio e compreensão nos momentos mais desafiadores. Menciono, em especial, minhas companheiras de mestrado na UEL: Stael e Larissa Chicoski. Amo todos vocês! Este mestrado não é apenas uma conquista pessoal, mas um esforço coletivo, e estou profundamente grata por ter tido a oportunidade de trilhar este caminho ao lado de pessoas tão incríveis. Obrigada a todos que trilharam o caminho desta grande realização!

DE ABREU, Samanta Stinghen. **Microplásticos no leite de consumo no Brasil: isolamento e caracterização**. 2024. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

## RESUMO

Microplásticos (MPs) são partículas sintéticas de tamanho  $<5$  mm, originadas geralmente da degradação de resíduos plásticos e contaminam vários compartimentos, inclusive os alimentos. O interesse em monitorar os MPs nas mais diversas amostras decorre dos potenciais riscos à saúde, conforme levantado em estudos com animais, que poderiam ser danosos também aos seres humanos. Embora haja diversos estudos sobre MPs em alimentos, especialmente em frutos do mar, poucos analisam o leite. São ausentes os dados referentes aos MPs nesse alimento no Brasil, um dos principais produtores mundiais de leite. Assim, este estudo se propõe a investigar a presença, quantificar e caracterizar MPs em 44 amostras de leite fluido de nove marcas de leite UHT e três marcas de leite pasteurizado (também denominado leite fresco), com diferentes teores de gordura. Após submeter as amostras à digestão oxidativa com peróxido de hidrogênio a 30% ( $H_2O_2$  30%), 344 partículas foram contabilizadas por microscopia óptica. Em seguida, a microscopia de fluorescência com a aplicação do corante Vermelho do Nilo permitiu detectar 68 potenciais MPs  $L^{-1}$  em 21 amostras, predominantemente e com maior carga em leite UHT. Essa técnica não havia sido relatada na análise de MPs em leite previamente. A carga média de potenciais MPs foi de 3,24 partículas  $L^{-1}$  nessa etapa, e predominaram os fragmentos translúcidos, com tamanho médio de 150  $\mu m$ . A maior frequência de partículas nessa etapa foi observada nas amostras de leite integral, mas a carga encontrada foi superior nos leites desnatados. Já na análise espectroscópica Raman, apenas três amostras de leite UHT integral de duas diferentes marcas apresentaram MPs confirmados, caracterizados como poliamida, em carga média de 2 MPs  $L^{-1}$ . O tamanho médio desses contaminantes foi de 200  $\mu m$ . Outras sete amostras de três marcas distintas foram consideradas potencialmente contaminadas, mas a análise do espectro não foi conclusiva. Considerando-as MPs, a carga média observada se elevaria a 2,6 MPs  $L^{-1}$ , provenientes majoritariamente das amostras do tipo UHT integral, havendo apenas uma marca de leite UHT desnatado e uma do tipo pasteurizado semidesnatado. Para visualização detalhada da superfície de algumas partículas, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, para a observação do desgaste e das características de partículas suspeitas, que se mostraram ásperas e com bordas desgastadas, em sua maioria. Pode-se concluir que os MPs estão presentes no leite de consumo, mas em quantidade pequena e inferior a encontrada em estudos com outras bebidas. Embora a microscopia de fluorescência com o corante Vermelho do Nilo seja simples e auxilie na semiquantificação de MPs, as amostras a ela submetidas tornam-se inutilizáveis para análise de espectroscopia Raman, impossibilitando a confirmação. Nenhuma das técnicas utilizadas se mostrou capaz de demonstrar a quantidade exata de MPs presentes no leite, estando sujeitas a falso negativos e/ou positivos. Assim, são requeridos outros estudos que tragam metodologias mais precisas, ampliem a amostragem e tragam informações sobre pontos de incorporação dos contaminantes neste alimento.

**Palavras-chave:** Microplásticos. Leite fluido. Vermelho do Nilo. Raman.

DE ABREU, Samanta Stinghen. **Microplastics in Brazilian milk: isolation and characterization**. 2024. 108 pp. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

## ABSTRACT

Microplastics (MPs) are synthetic particles <5 mm in size, which generally originate from the degradation of plastic waste and contaminate various compartments, including food. The interest in monitoring the presence of MPs in a wide variety of samples stems from the potential health risks, as raised in animal studies, which could also be harmful to humans. Although there have been several studies on MPs in food, especially seafood, few have analyzed milk. There is no data on MPs in this food in Brazil, one of the world's leading milk producers. Therefore, this study set out to investigate the presence, quantify and characterize MPs in 44 samples of fluid milk, including nine brands of UHT milk and three brands of pasteurized milk (also known as fresh milk) of different fat contents. After subjecting the samples to oxidative digestion with 30% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%), 344 particles were counted by optical microscopy. Fluorescence microscopy using the Nile Red dye then enabled 68 potential L<sup>-1</sup> MPs to be detected in 21 samples, predominantly and with a higher load in UHT milk. This technique had not previously been described in MPs analysis in milk. The average load of potential MPs was of 3.24 particles L<sup>-1</sup> at this stage, and translucent fragments predominated, with an average size of 150 µm. The highest frequency of particles at this stage was observed in whole milk, however, the load was higher in skimmed milk. In the Raman spectroscopy analysis, only three samples of UHT whole milk from two different brands showed confirmed MPs, characterized as polyamide, with an average load of 2 MPs L<sup>-1</sup>. The average size of these contaminants was 200 µm. Another seven samples from three different brands were considered potentially contaminated, but the spectrum analysis was inconclusive. Considering these MPs, the average load observed would amount to 2.6 MP<sub>s</sub>L<sup>-1</sup>, coming mostly from whole UHT samples, with only one brand of skimmed UHT milk and one of semi-skimmed pasteurized milk. Scanning electron microscopy was used to visualize the surface of some particles in detail, in order to observe the wear and characteristics of suspect particles, most of which were rough and had worn edges. It can be concluded that MPs are present in drinking milk, but in small quantities and less than those loads found in studies of other beverages. Although fluorescence microscopy with the Nile Red dye is simple and helps in the semi-quantification of MPs, the samples submitted to it become unusable for Raman spectroscopy analysis, making confirmation impossible. None of the techniques used proved capable of demonstrating the exact amount of MPs present in milk and were subject to false negatives and/or positives. Therefore, further studies are needed to provide more precise methodologies, expand sampling and provide information on the points at which contaminants are incorporated into this food.

**Key-words:** Microplastics. Fluid milk. Nile Red. Raman.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Sugestão de potenciais fontes de emissão de MPs para o leite 24
- Figura 2** – Hipótese das principais fontes de contato MPs para o ser humano, as rotas de exposição e as possíveis consequências à saúde 30
- Figura 3** – Processos de filtração aplicados em indústrias de laticínios e quais componentes do leite são retidos em cada caso, a depender do tamanho da malha do elemento filtrante 38
- Figura 4** – Frasco de Buchner utilizado na filtração à vácuo do leite para isolamento de MPs 41

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** – Características dos MPs detectados em estudos envolvendo o leite 34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcC	Acetilcelulose
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BaP	Benzo(a)pireno
BPA	Bisfenol A
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>2e</sub>	Dióxido de carbono equivalente
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EVA	Acetato-vinila de etileno
ETARs	Estações de Tratamento de Águas Residuais
FTIR	Espectroscopia por Infravermelho na Transformada de Fourier
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDS	Indicadores de Desenvolvimento Sustentável
KOH	Hidróxido de potássio
MERI	<i>Marine &amp; Environmental Research Institute</i>
MPs	Microplásticos
NaOH	Hidróxido de sódio
NOAA	Administração Nacional Oceânica e Atmosférica dos EUA
NY11	Nylon 11
PA	Poliamida
PAM	Poliacrilamida
PBS	Poli(succinato de butileno)
PCL	Policaprolactona
PE	Polietileno
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PEBD	Polietileno de Baixa Densidade
PET	Polietileno Tereftalato
PHB	Poli(hidroxibutirato)
PLA	Poli(lactídeo)
PMMA	Polimetilmetacrilato

PES	Poli(succinato de etileno)
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PP	Polipropileno
PSU	Polisulfona
PVC	Cloreto de polivinila
PVOH	Poli(álcool vinílico)
PU	Poliuretano
UHT	<i>Ultra Hight Temperature</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	HISTÓRICO DO PLÁSTICO .....	16
2.2	DEFINIÇÃO DE PLÁSTICO E SUAS CATEGORIAS .....	17
2.3	DEFINIÇÃO DE MICROPLÁSTICOS .....	19
2.4	ORIGENS DOS MICROPLÁSTICOS, LIBERAÇÃO NO AMBIENTE E A CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS .....	21
2.4.1	Origens dos Microplásticos e Fontes de Emissão.....	21
2.4.2	Contaminação Ambiental por Microplásticos e sua Relação com a Contaminação dos Alimentos.....	22
2.5	IMPLICAÇÕES AMBIENTAIS E PREOCUPAÇÕES RELACIONADAS À SAÚDE.....	24
2.5.1	Implicações ambientais.....	24
2.5.2	Aditivos, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) e o Efeito Cavalinho de Troia.....	25
2.5.3	Evidências de Preocupações de Saúde.....	27
2.6	MICROPLÁSTICOS NOS ALIMENTOS E NO LEITE.....	31
2.6.1	Detecção e Caracterização de Microplásticos em Alimentos .....	31
2.6.1.1	Estudos de Microplásticos em leite e caracterização das partículas.....	32
2.6.1.1.1	<i>Fatores que influenciam a quantidade de microplásticos em leite</i> .....	35
2.6.2	Métodos Utilizados Para Isolamento e Identificação de Microplásticos em Alimentos .....	38
2.6.2.1	Métodos relatados em estudos sobre Microplásticos em leite .....	38
2.6.2.1.1	<i>Tratamentos digestivos pré-filtração</i> .....	40
2.6.2.1.2	<i>Filtração a vácuo</i> .....	41
2.6.2.1.3	<i>Visualização microscópica (microscopia óptica e microscopia de fluorescência)</i> .....	42
2.6.2.1.4	<i>Visualização por microscopia eletrônica associada à espectroscopia de raios-X (SEM-EDX)</i> .....	43
2.6.2.1.5	<i>Técnicas espectroscópicas</i> .....	43
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	63

<b>5</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>64</b>
5.1	OBJETIVO GERAL.....	64
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
<b>6</b>	<b>ARTIGO – DETECÇÃO DE MICROPLÁSTICOS EM LEITE PASTEURIZADO E UHT.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>

## **APÊNDICES**

	APÊNDICE A – Fluxo de atividades executadas para a obtenção dos filtros com Microplásticos isolados.....	93
	APÊNDICE B – Tratamento de digestão aplicado às amostras.....	94
	APÊNDICE C – Critérios para a leitura dos filtros por microscopia Óptica.....	97
	APÊNDICE D – Protocolo para leitura dos filtros por microscopia de fluorescência.....	99
	APÊNDICE E – Critérios e metodologia prévia à visualização de partículas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	101
	APÊNDICE F – Comparação entre métodos de digestão do leite para a análise da eficiência na filtração.....	104

## **ANEXOS**

	ANEXO A – Procedimentos recomendados para redução de contaminação do ar, da contaminação cruzada e da contaminação durante a manipulação das amostras, realizados ao longo do presente estudo.....	108
--	--	-----

## 1 INTRODUÇÃO

O plástico é um dos materiais mais produzidos e utilizados no cotidiano, atendendo às necessidades de diversos setores por ser um componente versátil e acessível (Ramasaamy e Harit, 2023). Essas vantagens, no entanto, resultaram no uso indiscriminado dos plásticos (principalmente os de uso único) e, conseqüentemente, em taxas de descarte cada vez mais elevadas de um material degradado lentamente, o que passou a afetar principalmente os ecossistemas marinhos (Plastics Europe, 2022; Geyer et al., 2017; Jambeck et al., 2015; Napper and Thompson, 2016). Os microplásticos (MPs) são pequenas partículas que surgem em decorrência da exposição desses resíduos acumulados às intempéries ambientais, como a ação dos raios ultravioletas, dos sais e do vento (Guo and Wang, 2019; Tirkey et al., 2021). A definição de MPs abrange as partículas compostas por material polimérico sintético de tamanhos inferiores a 5 mm, e esses contaminantes vêm sendo alvo de estudos em amostras ambientais, biológicas e de alimentos, devido aos potenciais perigos que representam (Arthur et al., 2009). Considerados onipresentes, afetam os animais e os seres humanos ao entrarem na cadeia alimentar, sendo a via de ingestão a mais comum para se internalizarem no organismo (Galloway, 2015).

Estudos com peixes e camundongos apontam para o risco de danos à saúde, como o estresse oxidativo intestinal e inflamação (Lu et al., 2018; Qiao et al., 2019); a redução na secreção de mucina, geração de resposta inflamatória local, modificações na microbiota intestinal (Sun et al., 2021) e distúrbios metabólicos hepáticos (Zheng et al., 2021), o que levou a investigações mais aprofundadas a respeito da presença dessas partículas em amostras humanas e em alimentos. Entretanto, não há informações suficientes para dimensionar o risco dos MPs em causar danos ao organismo humano, já que desafios como as restrições éticas, a exigência de medidas rigorosas de biossegurança para trabalhar com amostras humanas, além da limitação metodológica e falta de padronizações dificultam o desenvolvimento de estudos (Prata et al., 2020). Prata e colaboradores (2020), contudo, propuseram efeitos potenciais que essas partículas podem provocar no organismo humano, baseados nos dados divulgados em saúde animal, sendo citados o estresse oxidativo aos tecidos e células, inflamação, translocação entre órgãos e a possibilidade de carcinogênese.

Por esse motivo, os estudos envolvendo a detecção e caracterização de MPs em alimentos vêm sendo realizados, e demanda-se a execução de mais trabalhos para a geração suficiente de dados para maiores conclusões sobre os perigos que esses contaminantes ingeridos possam representar. Sabe-se que a toxicidade dessas partículas depende de uma série de fatores, como sua composição polimérica, a presença de aditivos e/ou poluentes e as interações químicas ocorridas entre estes elementos, além do formato e tamanho (Qiao et al., 2019; Prata et al., 2020). Dessa forma, as análises de diversos alimentos têm sido reportadas, apontando a presença de MPs em peixes, mel, cerveja, leite, refrigerantes, entre outros (Silva-Cavalcanti et al., 2017; Diaz-Basantes et al., 2020). O leite é um item comum na dieta de indivíduos de todas as faixas etárias ao redor do mundo, havendo, até o momento, seis estudos de investigação de MPs neste alimento (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Da Costa Filho et al., 2021; Diaz-Basantes et al., 2020; Kiruba et al., 2022; Basaran et al., 2023; Zhang et al., 2023).

No Brasil, no entanto, nenhum estudo acerca da caracterização de MPs em leite fora publicado até o momento, o que representa uma lacuna importante, já que o cerca de 91,6% dos brasileiros consomem leite (Andretta et al., 2023; EMBRAPA, 2020). Com vistas a essa lacuna, o objetivo deste estudo foi contribuir com o cenário de entendimento da dispersão de MPs no leite, analisando amostras de diferentes marcas disponíveis no comércio de uma cidade brasileira quanto à presença de MPs. Essas partículas foram quantificadas e caracterizadas quanto à cor, formato e tamanho por meio de técnicas microscópicas, sendo os resultados comparados entre leites submetidos à diferentes tratamentos térmicos (pasteurização e processamento Ultra High Temperature – UHT) e de diferentes teores de gordura.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 HISTÓRICO DO PLÁSTICO

A modernização na produção de polímeros sintéticos teve início em meados da década de 1920, impulsionada principalmente pela incorporação de aditivos melhoradores de plásticos. Além desse avanço tecnológico, a introdução do cloreto de polivinila (PVC) possibilitou a diversificação das aplicações desses materiais no contexto cotidiano. Os polímeros termofixos já eram vastamente utilizados na década de 20, mas a difusão dos plásticos para uso comum somente ocorreu aproximadamente na década de 1950 (Geyer, R., 2020; Geyer et al., 2017). A partir desse ponto, a popularização dos plásticos se tornou notável, estendendo-se a diversas esferas, incluindo a medicina, a construção civil, a indústria automobilística e, notavelmente, as embalagens de alimentos, graças às vantagens inerentes, como o baixo custo e a elevada durabilidade (Ramamamy e Harit, 2023). Com a crescente demanda por esses materiais versáteis, resistentes e acessíveis, a produção anual de plásticos testemunhou um crescimento exponencial ao longo das décadas. Por exemplo, na década de 1970, a produção global anual girava em torno de 30 milhões de toneladas, contrastando com o valor registrado em 2022, conforme divulgado no último relatório publicado pela Plastics Europe, que ultrapassa 400 milhões de toneladas produzidas (Plastics Europe, 2023).

O mercado de embalagens é o principal consumidor de plásticos, influenciado pela mudança comportamental da substituição de recipientes reutilizáveis por recipientes de uso único. Em 2022, aproximadamente 44% de toda a produção mundial de plástico foi direcionada para embalagens (Plastics Europe, 2022). A extensa utilização de plásticos de uso único traz impactos ambientais significativos, contribuindo para o aumento da poluição por resíduos plásticos nos ecossistemas marinhos (Geyer et al., 2017; Jambeck et al., 2015; Napper e Thompson, 2016). Essa categoria de plásticos exerce uma influência substancial na geração e acumulação de MPs, devido à sua brevidade de uso, aliada à notável durabilidade e persistência no meio ambiente. Fatores como a composição do polímero, associado às condições ambientais a que estão expostos influenciam o tempo de decomposição desses resíduos, que pode estender-se por centenas a milhares de anos, enquanto seu uso se restringe a poucos minutos ou algumas horas (Corcoran, 2022).

## 2.2 DEFINIÇÃO DE PLÁSTICO E SUAS CATEGORIAS

O termo "plástico" é geralmente empregado para designar os polímeros sintéticos criados pelo ser humano, enquanto um polímero é definido como um conjunto de subunidades químicas semelhantes ligadas em cadeia (Geyer, 2020). Após a modernização da produção dos plásticos, o que inclui a agregação de aditivos e plastificantes na produção, é possível classificá-los em duas categorias distintas: termoplásticos e termofixos. Os termoplásticos, como o polietileno (PE), o polipropileno (PP), o cloreto de polivinila (PVC), o polietileno tereftalato (PET), o poliestireno (PS) e a poliamida (PA), são potencialmente recicláveis devido à capacidade de retornarem à sua conformação original após serem fundidos e resfriados novamente. Em outras palavras, o derretimento dos termoplásticos é um processo reversível. No entanto, é importante ressaltar que há limites para a manipulação desses polímeros sem que ocorram alterações significativas em sua estrutura e funcionalidade, tais como mudanças de cor e forma, modificações microestruturais e comprometimento das propriedades mecânicas (Radlmaier et al., 2017; Oliveira et al., 2017). Por outro lado, os termofixos, como o poliuretano (PUR), o poliéster insaturado, o silicone e as resinas epóxi, melamínicas, fenólicas e acrílicas, sofrem fusão de maneira irreversível, o que os torna não passíveis de reciclagem (Geyer, 2020). A característica fundamental que diferencia essas duas categorias é a reversibilidade ou irreversibilidade do processo de fusão dos plásticos, o que, por sua vez, determina a viabilidade da reciclagem.

Globalmente, os polímeros mais consumidos são os termoplásticos, que representam aproximadamente 80% do consumo, com a seguinte ordem de predominância: PE > PP > PVC > PET > PS (Bond et al., 2018; Al-Salem et al., 2009). Os termoplásticos são amplamente utilizados em embalagens e na produção de fibras têxteis. Notavelmente, quase metade da produção desses materiais é destinada aos plásticos de uso único, enquanto 20% a 25% são direcionados para infraestruturas de longo prazo, com o restante sendo empregado em aplicações duráveis com vida útil intermediária, tais como eletrônicos, móveis e veículos (Al-Salem et al., 2009; Kazemi et al., 2021). Por outro lado, no que diz respeito aos termofixos, os setores aeronáutico e automotivo representam os principais consumidores para aplicações de longa durabilidade (Geyer, 2020).

A categorização dos plásticos também pode ser realizada com base

em sua origem, distinguindo entre plásticos de origem fóssil e plásticos de origem biológica. Os polímeros de origem fóssil têm sua base no petróleo ou gás natural, enquanto os polímeros de base biológica podem ser derivados da biomassa de fontes como o milho e a cana-de-açúcar (Walker & Rothman, 2020; Geyer, 2020). É importante destacar a distinção entre os termos plásticos de origem biológica e plásticos biodegradáveis, uma vez que esses termos não são intercambiáveis. Conforme definido pela American Society for Testing and Materials (ASTM D883-17), a biodegradação de um material se refere ao "processo de decomposição realizado por microrganismos que ocorrem naturalmente, como bactérias, fungos e algas (ASTM D883-17, 2017)". Durante esse processo, o material deve ser completamente assimilado, sem deixar resíduos no ambiente natural.

Os polímeros biodegradáveis podem ter origem fóssil ou biológica, e nem todo plástico obtido por fontes renováveis é considerado biodegradável. Ou seja, a decomposição microbiológica independe da origem dos plásticos (Tokiwa et al., 2009). O PE e o Nylon 11 (NY11), por exemplo, apesar de não biodegradáveis, podem ser considerados bioplásticos quando extraídos de origens biológicas, como produtos derivados da fermentação e destilação da cana-de-açúcar (Tokiwa et al., 2009; Ciardelli et al., 2019). Por outro lado, polímeros como o poli(hidroxibutirato) (PHB), o poli(lactídeo) (PLA) e híbridos de amido possuem origem biológica e são biodegradáveis. Ainda, a acetilcelulose (AcC) apresenta uma redução na biodegradabilidade à medida que aumenta o grau de acetilação (Tokiwa et al., 2009). Por último, plásticos derivados de fontes não renováveis, como a policaprolactona (PCL), o poli(succinato de butileno) (PBS), o poli(succinato de etileno) (PES) e o poli(álcool vinílico) (PVOH), podem ser biodegradáveis, uma vez que são suscetíveis à degradação por microrganismos (Tokiwa et al., 2009; Iwata, 2015; Ciardelli et al., 2019).

Vários fatores intrínsecos à composição dos plásticos, como a mobilidade, cristalinidade, peso molecular, grupos químicos funcionais e tipos de aditivos utilizados na produção, exercem influência na degradação desses materiais (Artham e Doble, 2008). A degradação dos plásticos pode ocorrer de forma abiótica, quando expostos à temperatura, radiação, oxidação, umidade, ou de forma biótica, por meio da ação de bactérias, fungos e algas. O processo abiótico é o primeiro a ocorrer nos plásticos, levando a modificações visíveis, como alterações de cor, aparecimento de rachaduras e redução do peso. Na degradação biótica, os polímeros

são consumidos, resultando em moléculas como ácidos, aldeídos e água, bem como gases, como dióxido de carbono e metano (Silva et al., 2023). O mecanismo de biodegradação, que é o processo biótico, envolve a colonização microbiana na superfície do plástico e o início da atividade enzimática por hidrólise, resultando na geração de dióxido de carbono e água. Portanto, características como a área da superfície e as propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas dos plásticos influenciam, de modo geral, o mecanismo de biodegradação dos plásticos (Tokiwa et al., 2009).

A biodegradação é um processo vantajoso quando ocorre de maneira adequada, uma vez que contribui para o aumento da fertilidade do solo, a redução da acumulação de plásticos no meio ambiente, diminuindo a probabilidade de ingestão por animais, e a diminuição do impacto nos custos do gerenciamento de resíduos (Tokiwa et al., 2009). No entanto, é importante destacar a necessidade de equilíbrio entre diversas variáveis para que esse processo ocorra adequadamente. Fatores como grau de umidade, pH e temperatura afetam o desenvolvimento e a estabilidade dos microrganismos e suas enzimas e também influenciam as reações catalíticas (Tokiwa et al., 2009; Bahl et al., 2020). Um desafio notável associado à biodegradação incompleta dos plásticos é a formação de microplásticos (MPs), uma questão emergente e preocupante, uma vez que esses resíduos afetam diversos compartimentos ambientais, impactando diversos ecossistemas, tanto terrestres quanto aquáticos (Guzetti et al., 2018).

### 2.3 DEFINIÇÃO DE MICROPLÁSTICOS

Os MPs, conforme definido em 2009 pela Administração Nacional Oceânica e Atmosférica dos EUA (NOAA), consistem em partículas com dimensões inferiores a 5 mm (Arthur et al., 2009). Relatos da observação de partículas plásticas em sedimentos marinhos datam desde a década de 1970. No entanto, estimativas precisas de sua quantidade eram incertas devido à carência de métodos de delineamento e amostragem bem definidos (Carpenter e Smith, 1972; Colton et al., 1974; Day e Shaw, 1987; Moore et al., 2001; Thompson et al., 2004).

A classificação dos MPs pode ser efetuada com base em sua origem, distinguindo entre primários, que são produzidos para fins específicos (como as microesferas presentes em produtos de higiene e as microfibras de tecidos

sintéticos), e secundários, resultantes da degradação de plásticos maiores em decorrência da exposição ambiental (Rubio-Armendáriz et al., 2022; Andrady, A.L., 2011; Jönsson et al., 2018; Henry et al., 2019; De Falco et al., 2019). Outras abordagens de categorização de MPs incluem o formato das partículas (fragmentos, esferas, filmes, fibras, espumas), sua cor e a caracterização polimérica (Steer e Thompson, 2020). A caracterização dos MPs auxilia no entendimento da dinâmica da contaminação do ambiente ou da amostra biológica estudada, bem como dos potenciais impactos à saúde que possam causar (Peñalver et al., 2020). Contudo, a padronização dos procedimentos de classificação destes contaminantes ainda não foi consolidada, havendo diversidade no formato dos relatos na literatura, o que dificulta análises comparativas mais detalhadas e precisas (Gan et al., 2023).

A maioria dos pesquisadores lança mão de uma estratégia simples para iniciar a caracterização dos MPs, que é a inspeção visual, tanto a olho nu, como por microscopia. A microscopia é necessária para as partículas de dimensões inferiores a 1 mm (Song et al., 2015), e permite a classificação conforme o formato, a cor e o tamanho dos MPs. Entretanto, técnicas como a Espectroscopia por Infravermelho na Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia Raman são as mais aplicadas, por acessarem a composição polimérica das partículas detectadas com abordagem não destrutiva (Peñalver et al., 2020; Cabernard et al., 2018, Primpke et al., 2018; Lenz et al., 2015). Outra técnica aplicável para a identificação e quantificação de microplásticos é a aplicação do corante Vermelho do Nilo, uma abordagem simples e de baixo custo, mas que gera resultados mais assertivos quando associado às técnicas espectroscópicas (Shruti et al., 2022).

## 2.4 ORIGENS DOS MICROPLÁSTICOS, LIBERAÇÃO NO AMBIENTE E A CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS

### 2.4.1 Origens dos Microplásticos e Fontes de Emissão

A origem dos MPs liberados no ambiente pode ser categorizada como primária ou secundária. Conforme descrito por An e colaboradores (2020), a origem primária está relacionada a produtos como os pellets (matéria-prima de diversos produtos plásticos), as microesferas de plástico presentes em produtos cosméticos e de higiene pessoal, as tintas, as fibras de tecidos sintéticos (como poliéster e poliamida) e os fragmentos de pneus automotivos. Por outro lado, os MPs secundários, que são os mais comuns no ambiente, são provenientes dos resíduos gerados pelo uso cotidiano de itens de plástico, como sacolas descartáveis, embalagens de alimentos, componentes de eletrodomésticos, entre outros (An et al., 2020). As fontes de emissão dos MPs para o meio ambiente incluem o esgoto doméstico, os efluentes de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) e efluentes de lavanderias. É registrado que aproximadamente 1.900 fibras por peça de roupa podem ser liberadas nos efluentes de máquinas de lavar domésticas (Browne et al., 2011). Em relação aos efluentes provenientes de ETARs, apesar da alta eficiência dos tratamentos, estudos indicam a liberação de até 65 milhões de partículas por dia (Murphy et al., 2016).

Os MPs secundários são gerados e liberados na natureza devido às intempéries ambientais, como a exposição aos raios ultravioleta, ações das ondas e do vento e atividade microbiana (Guo and Wang, 2019; Tirkey et al., 2021). Geyer e colaboradores (2017), apontam, com base em estimativas globais, que cerca de 79% dos resíduos plásticos gerados entre 1950 e 2015 permanecem em aterros sanitários, depósitos ou no meio ambiente, enquanto 12% foram incinerados e apenas 9% foram reciclados. Outra estimativa alarmante aponta que, a cada ano, cerca de 10 milhões de toneladas destes resíduos são lançados nos oceanos (Jambeck et al., 2015). Se as tendências atuais de produção e gerenciamento de resíduos plásticos persistirem, é esperado que até 2050, aproximadamente 12.000 toneladas desses resíduos atinjam aterros ou o meio ambiente, com o potencial de se fragmentarem em MPs, interagirem com outros contaminantes e se dispersarem entre os compartimentos ambientais, impactando a qualidade da água e a segurança dos alimentos (Geyer et

al., 2017).

#### 2.4.2 Contaminação Ambiental por Microplásticos e sua Relação com a Contaminação dos Alimentos

Diante dos dados preocupantes apresentados sobre a produção e destino dos plásticos, fica evidente o motivo pelo qual os MPs são considerados onipresentes, sendo detectados inclusive em locais remotos e profundos, como a Fossa das Marianas (Peng et al., 2018; Jamieson et al., 2019). Sedimentos marinhos, solo e ar são exemplos de compartimentos ambientais frequentemente investigados para a identificação de MPs (Näkki et al., 2019; Fuller e Gautam, 2016; Gaston et al., 2020). Uma vez que esses ecossistemas estão sendo atingidos pela contaminação por MPs, a biota local também é impactada, como comprovado em estudos que detectaram MPs em organismos aquáticos e terrestres, vegetais e frutas (Adeogun et al., 2020; Beriot et al., 2021; Oliveri-Conti et al., 2020). De acordo com Jin e colaboradores (2021), a incorporação de MPs em alimentos pode ocorrer por basicamente três vias. A primeira delas é entrando na cadeia alimentar, quando animais marinhos e terrestres os ingerem, ou quando as raízes das plantas absorvem MPs e, subsequentemente, afetam outros animais de níveis tróficos superiores e os seres humanos no topo da cadeia alimentar (Bradney et al., 2019; Horton et al., 2017). Outra forma comum é o desprendimento de partículas de embalagens plásticas de alimentos durante o processamento, como pode ocorrer com o sal, o leite, o mel, a cerveja e os refrigerantes (Iñiguez et al., 2017; Diaz-Basantes et al., 2020). A terceira via está relacionada ao processamento do alimento, por meio da matéria-prima ou água industrial contaminada, sendo usada como ingrediente ou na limpeza ao longo do processamento, além das etapas de armazenamento, transporte e embalagem também serem apontadas como possíveis momentos de contaminação dos alimentos (Jin et al., 2021; Zhang et al., 2020).

Seguindo esse raciocínio, em relação ao leite, os MPs detectados podem ser provenientes diretamente dos animais devido à ingestão de macro ou microplásticos pelas fêmeas produtoras nos alimentos, na água e na atmosfera. As partículas podem se alojar na glândula mamária e, eventualmente, serem eliminadas durante a ordenha (van der Veen et al., 2022). Alternativamente, esses contaminantes podem ser incorporados em diversos pontos do processamento, incluindo

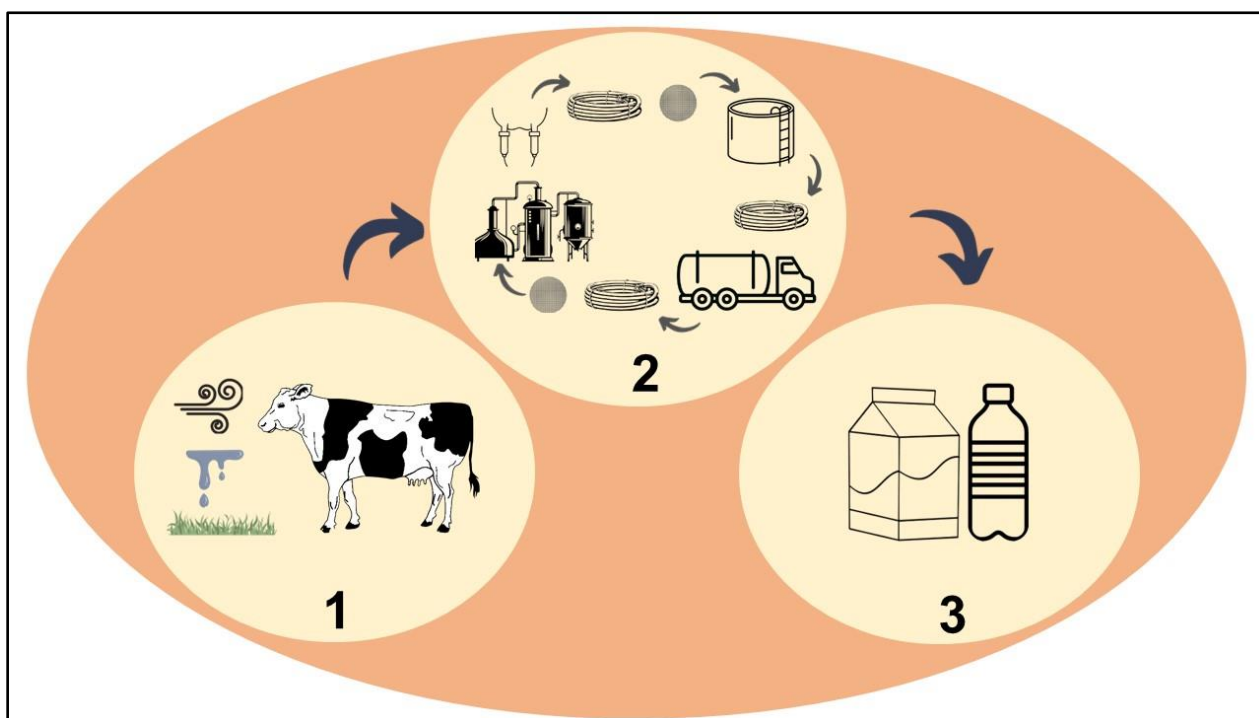
equipamentos e utensílios, como tanques, mangueiras e tubulações, que podem conter MPs aderidos após a limpeza com água contaminada. O potencial da água em ser um dos fatores responsáveis pela contaminação de MPs no leite é evidente: o consumo de água relacionado à ordenha pode chegar a 3,4 L para cada litro de leite produzido em propriedades de média produção, excluindo-se desse valor a água utilizada em etapas prévias da atividade (ex: produção de pasto e dessedentação dos animais) e posteriores (ex: transporte do leite) (Willers et al., 2014).

Adicionalmente, os MPs podem desprender-se de utensílios de plástico utilizados na produção, como as mangueiras de PVC ou silicone frequentemente empregadas em fazendas e indústrias beneficiadoras. É importante ressaltar que os plásticos empregados nesses utensílios são adequados para o contato com alimentos, não contendo aditivos. No entanto, são passíveis de enrijecimento, quebras e formação de ranhuras ao longo do uso, principalmente devido às lavagens com detergentes ácidos e alcalinos e água em diferentes temperaturas. O leite passa por etapas de filtração durante o processamento, retendo parte dessas partículas; entretanto, as partículas de dimensões inferiores à porosidade dos filtros seguem o fluxo junto ao alimento. Além disso, os próprios filtros empregados nas indústrias já foram apontados como possível fonte de MPs no leite (Kutralam-Muniasamy et al., 2020).

Na última etapa da industrialização do leite ocorre o contato com outra fonte de emissão de MPs, que são as embalagens. Fatores como a idade dos recipientes de plástico, a exposição ao estresse mecânico e ao estresse térmico determinam a liberação dos MPs nestes itens (Jadhav et al., 2021). No Brasil, atualmente, são utilizadas embalagens de PEBD ou PET para o leite pasteurizado, e embalagens cartonadas ou PET para o leite UHT, além de algumas marcas disponibilizarem versões em embalagens de vidro. É válido ressaltar que as embalagens cartonadas são compostas por múltiplas camadas, incluindo papelão (75%), alumínio (5%) e PEBD (20%) como a camada final em contato com os alimentos (Borges, 2007). Consideradas compósitos (formadas por mais de um tipo de material), a reciclagem é dificultada, requerendo tecnologias caras para a desagregação dos componentes (Santos et al., 2017). A última taxa de reciclagem desse tipo de embalagem, divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi inferior a 30%, conforme divulgado nos Indicadores de Desenvolvimento Sustentável (IDS) (IBGE, 2015).

Com base nas informações levantadas, a Figura 1 reúne as possíveis fontes de emissão de MPs capazes de contaminar o leite.

**Figura 1** - Sugestão de potenciais fontes de emissão de MPs para o leite



Fonte: a própria autora (2023)

**1:** Fêmeas produtoras podem incorporar MPs da atmosfera, dos alimentos e da água, podendo se alojar na glândula mamária. **2:** Durante a ordenha e o processamento, o leite entra em contato com diversos utensílios e equipamentos que podem conter MPs advindos da água de lavagem, ou dos próprios objetos constituídos por plástico. Os filtros, já apontados anteriormente como um ponto possível de liberação de MPs, são empregados antes da entrada do leite ao tanque, e antes da recepção do produto pela indústria. **3:** Por fim, o leite pode ser contaminado por MPs eventualmente liberados das embalagens, dependendo de fatores como a idade desta embalagem, a exposição à estresse mecânico e estresse térmico.

## 2.5 IMPLICAÇÕES AMBIENTAIS E PREOCUPAÇÕES RELACIONADAS À SAÚDE

### 2.5.1 Implicações Ambientais

Os principais fatores relacionados à ameaça da biodiversidade incluem a modificação de habitats, a exploração de recursos, a introdução de espécies invasoras, as mudanças climáticas e a poluição, sendo que os plásticos desempenham um papel significativo nos dois últimos fatores (Young et al., 2016). Ford e colaboradores (2021), reuniram evidências importantes indicando que o plástico contribui para a emissão de gases de efeito estufa durante seu ciclo de vida. Além disso, os mesmos autores apontam que as mudanças climáticas e a poluição

plástica ocorrem simultaneamente, e os fenômenos resultantes da mudança climática contribuem para a distribuição dos resíduos plásticos no ambiente. Como mencionado anteriormente, a produção de plástico teve um aumento exponencial ao longo do tempo, e a tendência é a continuidade desse crescimento. Com base nisso, Zheng e Suh (2019), estimam que a emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) do plástico aumentaria de 1,7 bilhões de toneladas de dióxido de carbono equivalente (CO<sub>2</sub>e) em 2015 para 6,5 bilhões de toneladas de CO<sub>2</sub>e em 2050.

De acordo com Kumar (2018), o consumo de energia relacionado à urbanização gera um aumento na emissão de gases de efeito estufa, capazes de absorver calor e aumentar o aquecimento da Terra. O CO<sub>2</sub>, principal gás do efeito estufa liberado na atmosfera pela queima de combustíveis fósseis, aumentou 40% nos últimos 200 anos, contribuindo para o aquecimento da Terra em cerca de 0,8 °C (Kumar, 2018). Os resultados catastróficos da mudança climática envolvem o aumento da temperatura dos oceanos, o aumento do nível do mar, a acidificação dos oceanos e eventos climáticos com impactos ecológicos e socioeconômicos (Ford et al., 2021).

Em relação à poluição causada pelos resíduos plásticos e à geração de MPs, a literatura destaca diversos problemas graves, principalmente na fauna marinha. Estimativas indicam que até 2050, 99% das aves marinhas terão ingerido plásticos durante a vida, e o peso dos resíduos plásticos nos oceanos ultrapassará o peso dos peixes (Wilcox et al. 2015). Danos causados por macro ou microplásticos, como emaranhamento, asfixia, toxicidade e inanição são frequentemente relatados em estudos (Thushari e Senevirathna, 2020). O emaranhamento está relacionado à atividade de pesca, devido às redes e cordas plásticas acumuladas nos mares, enquanto a ingestão geralmente envolve fragmentos de plástico (Gall e Thompson, 2015). Os resultados dessas interações entre os animais e os resíduos plásticos incluem a redução da ingestão de alimentos, perda de mobilidade, prejuízos à capacidade reprodutiva, redução da capacidade de fugir de predadores e redução do crescimento e da condição corporal, ameaçando seriamente a biodiversidade (Thushari e Senevirathna, 2020; Gall e Thompson, 2015).

### 2.5.2 Aditivos, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) e o Efeito Cavalinho de Troia

Dentre os perigos discutidos acerca da interação dos organismos

vivos com os MPs, estão os efeitos tóxicos gerados por aditivos dos plásticos e/ou poluentes. Em outras palavras, a toxicidade dos MPs depende da presença desses aditivos e/ou poluentes, bem como do tipo de polímero, além da presença/ausência de biofilme e condições ambientais (Atugoda et al., 2021). Os aditivos aprimoram funções dos plásticos e podem ser encontrados como traços ou como componentes principais dos produtos, sendo que são fracamente ligados às moléculas dos polímeros, podendo ser liberados durante o uso e a degradação do plástico (Pinto da Costa et al., 2023). Os ftalatos, por exemplo, tornam os plásticos mais flexíveis e maleáveis, sendo empregados em diferentes aplicações, como o PVC para revestimentos de pisos, paredes, brinquedos, embalagens de alimentos e dispositivos médicos (Root et al., 2017; Notardonato et al., 2019). Os bisfenóis, principalmente o bisfenol A (BPA), são usados como monômeros na produção de policarbonatos e resinas epóxi (Guart et al., 2011). Esses dois tipos de aditivos são vastamente estudados devido aos potenciais danos que geram à saúde. Problemas reprodutivos e de desenvolvimento genital masculino devido à disfunção endócrina são efeitos relacionados a estas substâncias (Singh e Li, 2012).

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) são aqueles que permanecem no ambiente por longos períodos, como pesticidas, produtos químicos industriais e subprodutos de processos industriais, como dioxinas e furanos (Alharbi et al., 2018). Por serem persistentes no ambiente, considera-se que praticamente todos já tenham entrado em contato com algum desses poluentes, evidenciado pela detecção de POPs em grupos de indivíduos de diferentes idades. Concentrações elevadas foram encontradas em populações idosas, indicando o efeito de bioacumulação (Scheringer, 2009; Alharbi et al., 2018). O encontro entre partículas de MPs, seus resíduos de aditivos e os POPs no ambiente pode agravar efeitos deletérios à saúde, caso sejam ingeridos por animais e seres humanos, num fenômeno definido como o efeito cavalo de Troia (Hu et al., 2022). Entretanto, a interação entre esses elementos poluentes não significa necessariamente o desencadeamento desse fenômeno, já que a toxicidade das misturas depende da composição do polímero e da natureza dos POPs, podendo resultar em efeito sinérgico, potencializador, aditivo, antagônico ou inibidor (Bhagat et al., 2021; Syberg et al., 2015). Além dos POPs mencionados, também são citados como elementos carregados no efeito cavalo de Troia pelos MPs os metais pesados, os patógenos e os resíduos farmacológicos (inclusive de antimicrobianos) (Hu et al., 2022).

### 2.5.3 Evidências de Preocupações de Saúde

Um dos principais motivadores para o estudo aprofundado da dinâmica de formação e dispersão dos MPs, além do comprometimento ambiental, é o entendimento dos potenciais riscos à saúde representados pelas partículas em si, ou pelas complexas misturas delas com aditivos, bem como aos diversos poluentes e patógenos presentes no meio ambiente. Alguns resultados de estudos sobre o efeito cavalo de Troia são instigantes e alarmantes, como a geração de citotoxicidade mediada pela interação entre um polímero e um contaminante sobre hemócitos, principal frente de defesa imunológica de bivalves. Katsumiti e colaboradores (2021) comprovaram que partículas de PS são capazes de carregar o POP benzo(a)pireno (BaP); no entanto, os danos celulares foram observados apenas em concentrações mais altas tanto do polímero quanto do contaminante. Mesmo assim, o estudo evidencia a ameaça ao comprometimento da saúde de organismos aquáticos devido à possibilidade de interações perigosas entre este microplástico e este POP no efeito cavalo de Troia, provocando danos como a perda de viabilidade celular e da fagocitose, aumento da produção de radicais livres e da genotoxicidade.

Por outro lado, a ausência de prejuízos à saúde de organismos aquáticos também é um resultado possível nos estudos da área. O PE, por exemplo, não aumentou a toxicidade do clorpirifós e hexaclorobenzeno (produtos com aplicação agrícola) em Zebrafish (*Danio rerio*), como demonstrado pela alteração de apenas um dos biomarcadores testados no estudo de Schell e colaboradores (2021). Lohmann (2017) propôs uma discussão acerca do papel dos MPs no ciclo e na bioacumulação de POPs, sugerindo que os MPs deveriam ser considerados POPs e, portanto, contar com a Convenção de Estocolmo para reduzir suas fontes. O autor fundamenta-se em suas conclusões, indicando que há poucas evidências de que os MPs sejam um importante vetor de transferência de POPs para os animais, de modo geral. Entretanto, isso não significa que os MPs não possam atuar como cavalos de Troia e aumentar a toxicidade de determinados contaminantes de maneira mais significativa e potente, uma vez que as interações dependem da composição polimérica e da natureza do poluente em questão, como exemplificado por Lohmann a respeito da interação entre MPs e retardadores de chamas (Bhagat et al., 2021; Lohmann, 2017). Além disso, é válido pontuar que muitos estudos representam a realidade *in vitro*, enquanto durante a decomposição natural os MPs podem ter interações aleatórias e

múltiplas com diversos contaminantes, bem como sofrer alterações morfológicas de formato, tamanho e superfície, o que pode interferir no grau de danos gerados ao ambiente e aos seres que entrarem em contato com essas partículas (Guo and Wang, 2019; Tirkey et al., 2021; Rincon-Rubio et al., 2001; Lambert and Wagner, 2016; Zettler et al., 2013; Rouillon et al., 2016).

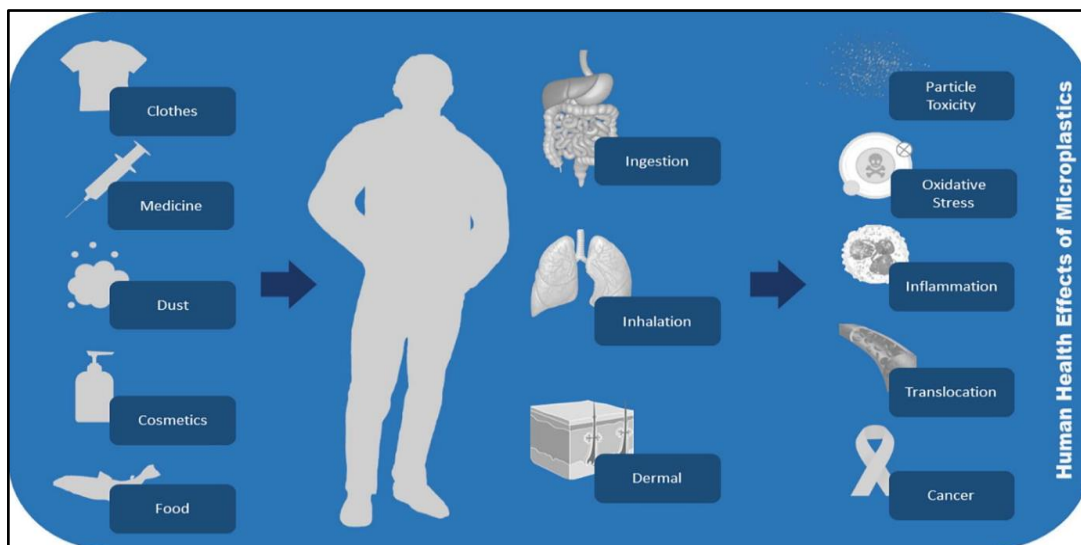
Ainda que nem sempre o efeito cavalo de Troia ocorra ou represente um perigo significativo à saúde, as partículas poliméricas em si aparentam ter o potencial de danificar as células e tecidos. Por se tratarem de fragmentos físicos e exógenos, são reconhecidos como estranhos pelo organismo, havendo o potencial de desencadeamento da resposta inflamatória. No caso de MPs inalados, os macrófagos ou células epiteliais locais podem desencadear a inflamação, além da possibilidade de transporte das partículas para a pleura ou para a circulação sistêmica, a depender de fatores intrínsecos aos MPs (que são alterados ao sofrerem interferências das intempéries ambientais) e de fatores individuais (Ramsperger et al., 2020). A exposição via ingestão a longos períodos ao Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) provocou resposta pró-inflamatória no intestino de *Sparus aurata*, o peixe Dourado, havendo remissão total dos sinais no tecido analisado após a suspensão da oferta dos MPs (Solomando et al., 2020). Outros estudos observacionais dos efeitos da ingestão de MPs (PS) com a espécie *Danio rerio* relataram infiltrações e danos celulares nos cortes histológicos analisados, além de alterações relacionadas ao estresse oxidativo intestinal e à inflamação (Lu et al., 2018; Qiao et al., 2019). Os resultados divulgados por Qiao e colaboradores (2019) reforçam ainda a dependência do formato das partículas sobre o grau de acumulação nos órgãos, e consequentemente a intensidade de danos gerados, sendo as fibras as mais eficientes nesse quesito, quando comparadas aos fragmentos e esferas. O PE provocou algumas alterações no cólon de camundongos, como a redução na secreção de mucina, geração de resposta inflamatória local leve, além de modificações na microbiota intestinal que interferem no metabolismo de aminoácidos (Sun et al., 2021).

Zheng e colaboradores (2021) destacam, a partir da observação dos efeitos do PS ingerido por camundongos durante 28 dias, a particularidade dos indivíduos portadores de doenças crônicas, que aparentemente são ainda mais prejudicados quando expostos aos MPs. No estudo em questão, o PS desencadeou respostas inflamatórias e distúrbios metabólicos hepáticos. Nos indivíduos com colite

aguda induzida, houve agravamento dessa condição, adicionada às perturbações no metabolismo lipídico, com acúmulo de triglicerídeos e expressão de fatores pró-inflamatórios (Zheng et al., 2021). Os autores explicam que as diferenças observadas entre os grupos provavelmente se devem à maior permeabilidade intestinal nos animais com colite, permitindo a maior evasão de MPs para a corrente sanguínea, que se encaminham e se acumulam no ambiente hepático, acentuando os danos em comparação ao grupo saudável (Zheng et al., 2021; Denker e Nigam, 1998).

Quanto aos estudos voltados para as preocupações de saúde humana, os dados são escassos, uma vez que há barreiras para a execução de experimentos, como as restrições éticas, a exigência de medidas rigorosas de biossegurança para trabalhar com amostras humanas, além da limitação metodológica e falta de padronizações (Prata et al., 2020). Por ser um tema relativamente novo, há lacunas no entendimento da exposição e do mecanismo de toxicidade dos MPs. As evidências sobre a função das comorbidades e dos determinantes sociais na exposição aos MPs também são tópicos essenciais a serem compreendidos (Rahman et al., 2021). Prata e colaboradores (2020) levantaram hipóteses das possíveis fontes e rotas de exposição aos MPs, bem como as principais vias de toxicidade geradas por eles, conforme representado na Figura 2. Os autores apontam a necessidade de compreender a exposição humana aos MPs, especialmente quando se trata de partículas inferiores a 10  $\mu\text{m}$ , uma vez que quanto menor a partícula, maior o potencial de se transportar pelo organismo e acessar diferentes tecidos (Prata et al., 2020). Isso foi evidenciado em um estudo que observou citotoxicidade e hemólise após a interação *in vitro* entre o PVC (partículas de 2  $\mu\text{m}$ ) e células pulmonares humanas e de camundongos (Xu et al., 2002).

**Figura 2** – Hipótese das principais fontes de contato MPs para o ser humano, as rotas de exposição e as possíveis consequências à saúde



Fonte: Prata et al. (2020)

Mesmo com os desafios apontados anteriormente acerca dos estudos envolvendo amostras biológicas de origem humana, alguns tecidos e fluidos foram alvos de investigação de MPs, confirmando a presença de tais partículas. Um estudo revelou que 13 entre 20 amostras de tecido pulmonar provenientes de autópsia apresentaram partículas poliméricas e fibras (31 MPs no total, compostos principalmente por PP e PE, de tamanhos entre 1,6  $\mu\text{m}$  e 5,56  $\mu\text{m}$ ), resultado que colabora para entendimento do nível de interação com os contaminantes pelo ar inspirado (Amato-Lourenço et al., 2021). O tecido cardíaco proveniente de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca também foi analisado em outro estudo, com a identificação de nove tipos de MPs, principalmente PET e poliuretano (PU) (dimensões entre 20 a 469  $\mu\text{m}$ ) (Yang et al., 2023). Os MPs também foram encontrados na placenta humana em todas as amostras testadas por Zhu e colaboradores (2023), a maior parte sendo identificada como PVC, com tamanhos entre 20 a 307  $\mu\text{m}$ , sendo 80.29% das partículas <100  $\mu\text{m}$ . O PVC havia sido apontado previamente como o polímero mais significativo para os possíveis riscos à saúde humana na cadeia alimentar, devido aos potenciais riscos de comprometimento reprodutivo demonstrado por alterações em espermatozoides de ratos, além de ser potencialmente hepatotóxico e carcinogênico (Sadeghi et al., 2020). A exposição dos espermatozoides humanos aos MPs também foi estudada, com a detecção de diferentes tipos de MPs em seis de dez amostras coletadas (principalmente PP, PS e PE, com uma ocorrência de PVC) (Montano et al., 2023).

Mesmo que os danos à saúde humana ainda não tenham sido

comprovados, os monitoramentos da presença de MPs no ambiente, nas amostras biológicas e nos alimentos continuam sendo importantes, para aumentar a compreensão de quais formatos e tipos de partículas os ecossistemas e os seres humanos estão sendo expostos. Destaca-se ainda a questão da própria poluição plástica como uma ameaça à saúde única (equilíbrio entre a saúde ambiental, animal e humana). Além da poluição ambiental e, conseqüentemente, dos alimentos, o uso e descarte desenfreados dos plásticos prejudica a biodiversidade e colabora para a mudança climática, com o notável aumento das temperaturas médias em diversos países (Young et al., 2016). Dados de diferentes órgãos científicos apontam que, provavelmente, 2023 será o ano com o recorde de temperaturas máximas já registradas na história, por ações do efeito estufa somados a anomalias notadas no fenômeno El Niño (Hausfather, 2023). As conseqüências da mudança climática, como inundações e incêndios florestais, afetam os sistemas de saúde ao redor do globo. A elevação da temperatura nos últimos anos provocou um aumento na taxa de mortes relacionadas ao calor em 68%, arriscando a vida principalmente de idosos e crianças com menos de um ano de idade (Romanello et al., 2022).

## 2.6 MICROPLÁSTICOS NOS ALIMENTOS E NO LEITE

### 2.6.1 Detecção e Caracterização de Microplásticos em Alimentos

As evidências da interação humana com os MPs por meio da ingestão foram comprovadas pela presença dessas partículas em fezes humanas (Schwabl et al., 2019). Os MPs entram no organismo humano principalmente por meio da ingestão, além da incorporação pela inalação e contato dérmico (Galloway, 2015; Prata et al., 2020). Destaca-se que o polietileno de alta densidade (PEAD) é o polímero mais comumente encontrado nas fezes, sugerindo que uma fonte significativa de ingestão seja a pasta dental, além de embalagens (Luqman et al., 2021).

Cox e colaboradores (2019), estimaram o consumo diário de MPs com base nas informações disponíveis sobre a carga de contaminação de vários alimentos e do ar. Concluíram que a quantidade ingerida provavelmente está entre 39.000 e 52.000 partículas por pessoa por dia, com impacto nessas quantidades conforme a idade e o gênero. Devido à importância da ingestão como rota de contaminação para os seres humanos, diversos estudos sobre a detecção de MPs foram desenvolvidos

para obter informações sobre as partículas que poderiam afetar a população, incluindo, por exemplo, o sal, cerveja, mel, refrigerantes, leite, frutas e vegetais, entre outros alimentos comumente consumidos (Yang et al., 2015; Karami et al., 2017; Diaz-Basantes et al., 2020; Oliveri-Conti et al., 2020).

Domenech e Marcos (2021), realizaram um levantamento das taxas de ingestão de micro e nanoplásticos com base nos dados relacionados à carga de contaminação em alimentos, associados às recomendações de ingestão diária. Por exemplo, considerando que frutas e vegetais apresentaram, em média, 132.740 partículas de MPs por grama (Oliveri-Conti et al., 2020), somente esse segmento da dieta, se ingerido nas recomendações adequadas (400 g/dia), resultaria na incorporação de  $53.096 \times 10^6$  partículas/dia (Domenech e Marcos, 2021). Seguindo ainda o critério de ingestões recomendadas ou as médias de consumo global dos alimentos, as estimativas das contribuições do sal de mesa e dos frutos do mar (espécies aquáticas) foram de 0,714 partículas/dia e  $22,04 \times 10^3$  partículas/ano, respectivamente (Domenech e Marcos, 2021; Kim et al., 2018; Kosuth e Wattenberg, 2018; Lee et al., 2019; Kim et al., 2018; Guillen et al., 2019). Os autores destacam a dificuldade em estimar esses parâmetros de forma geral, principalmente devido à ausência de protocolos e metodologias robustas e padronizadas para a detecção e quantificação dessas partículas, o que dificulta comparações entre os dados reportados, já que os resultados encontrados na literatura podem ser extremamente variáveis (Domenech e Marcos, 2021).

#### 2.6.1.1 Estudos de Microplásticos em leite e caracterização das partículas

Devido ao alto valor nutricional, o leite está presente na alimentação humana desde a infância até as idades mais avançadas (Basaran et al., 2023; Scholz-Ahrens et al., 2020). Dados divulgados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em 2020 afirmam que cerca de 80% da população mundial é consumidora de leite, assim como 91,6% dos brasileiros (Andretta et al., 2023; EMBRAPA, 2020). No entanto, apenas alguns países estudaram MPs no leite, e no Brasil ainda não há dados sobre o assunto nesse alimento. A maior parte das pesquisas sobre a detecção de MPs em alimentos no Brasil concentra-se em peixes (Andrade et al., 2019; Pegado et al., 2018; Silva-Cavalcanti et al., 2017; Ferreira et al., 2016; Vendel et al., 2017), sendo ainda imprescindível realizar essa análise em outros

produtos alimentícios, inclusive os derivados lácteos, uma vez que se trata de dimensionar um problema potencialmente relacionado à saúde humana (Basaran et al., 2023; Nakat et al., 2023; Prata e Dias-Pereira, 2023). Os levantamentos de dados sobre MPs no leite são recentes, sendo que a primeira publicação envolvendo este alimento foi em 2020 (Kutralam-Muniasamy et al., 2020). Os estudos geralmente abrangem informações como cor, formato, quantidade, tamanho e composição polimérica das partículas visualizadas, embora os tipos de amostras variem conforme a realidade de cada país.

O Quadro 1 compila os resultados divulgados pelas pesquisas de MPs no leite, tendo sido identificados seis trabalhos até o momento do desenvolvimento do presente estudo. Observa-se a ausência de trabalhos publicados pela comunidade científica brasileira, uma lacuna a ser preenchida, considerando o impacto do Brasil como potência na atividade leiteira. Outros países que lideram os índices de produção leiteira, como os Estados Unidos da América e países membros da União Europeia, também carecem de contribuições de informações sobre MPs no leite.

Evidencia-se que fibras e fragmentos são os formatos de MPs predominantes no leite, considerando os relatos disponíveis. A composição polimérica detectada é variável, observando-se maior frequência de polipropileno (reportado em cinco estudos) e polietileno (reportado em quatro estudos), os dois termoplásticos mais consumidos em escala global (Bond et al., 2018; Al-Salem et al., 2009). A comparação entre resultados dos estudos envolvendo MPs em leite, assim como outros relatos de MPs em alimentos é complexa devido à variedade de metodologias aplicadas, muito em face à necessidade de retirar os resíduos orgânicos da amostra por métodos digestivos. Os constituintes do leite, sobretudo a gordura, interferem na filtração do produto, necessária para o resgate dos MPs, bem como na visualização, uma vez que os corantes podem se fixar nesses resíduos. O aquecimento foi o método mais utilizado até então como uma forma de facilitar a filtração do leite, podendo degradar alguns compostos orgânicos do alimento, mas de forma muito menos intensa do que é possível obter com a adição de reagentes químicos à amostra.

**Quadro 1** - Características dos MPs detectados em estudos envolvendo o leite

Amostras (n)	Método digestivo	Qtd. de MPs	Porosidade do filtro ( $\mu\text{m}$ ) e tamanho médio MPs ( $\mu\text{m}$ )	Formatos	Cores	Composição	País	Referência
23 (leite fluido)	Aquecimento (?°C)	$6,5 \pm 2,3 \text{ L}^{-1}$	11; 100 - 5.000	Fibras e fragmentos	Azul, vermelho, marrom, verde e rosa	Polisulfona (PSU)	México	Kutralam-Muniasamy et al., 2020
6 (4 leite fluido e 2 leite em pó)	Multienzimático e hidrólise alcalina quente (TMAH 25%)	$2.040 - 10.040 \text{ L}^{-1}$	$5; \geq 5$	Fibras e fragmentos	N.C.	PE, PES, PP, PTFE, PS	Suíça	Da Costa Filho et al., 2021
10 (leite fluido)	Oxidativo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ 30%)	$40 \text{ L}^{-1}$	10; 2,48 - 6.742,48	Fibras e fragmentos	Verde, amarelo, vermelho, violeta e azul	PE, PP, poliacrilamida (PAM)	Equador	Diaz-Basantes et al., 2021
16 (leite fluido)	Aquecimento (?°C)	$164 - 427 \text{ L}^{-1}$	11; < 500	Fibras, fragmentos e pellets	Rosa, roxo e azul	PE, PP, PAM	Índia	Kiruba et al., 2022
14 (leite fluido)	Aquecimento (máx. 40°C)	$6 \pm 5 \text{ L}^{-1}$	10; 25 - 5.050	Fibras e fragmentos	Preto, vermelho, verde, azul, marrom e cinza	Acetato-vinila de etileno (EVA), PET, PP, PUR, Nylon-6	Turquia	Basaran et al., 2023
13 (leite em pó)	Simulação da digestão gástrica e intestinal	$10 \pm 10 - 110 \pm 10 \text{ Kg}^{-1}$	8; $253 \pm 384$	Fibras, fragmentos e filmes	N.C.	PE, PET, PP, PA, PVC	China	Zhang et al., 2023

N.C.: não consta

**Fonte:** a própria autora (2023)

O método digestivo pode interferir na quantidade detectada e nas características observadas nos MPs, uma vez que mudanças morfológicas podem ocorrer, ou até mesmo a perda completa de partículas, a depender de diversos fatores. A composição polimérica do material, bem como o tamanho, a idade e fatores estressantes ambientais a que já foram previamente expostos são determinantes na resistência das partículas frente ao método selecionado para a digestão, sendo também citados como fatores importantes na reação a temperatura aplicada no tratamento e o volume de reagente utilizado (Savino et al., 2022). Essas interferências logicamente provocam alterações importantes nas análises microscópicas e espectroscópicas, podendo impactar na diversidade de resultados obtidos em diferentes estudos.

Nota-se que a menor porosidade de filtros relatada até o momento foi de 5  $\mu\text{m}$  para estudos com leite, possibilitando a detecção de um número consideravelmente maior de MPs quando comparado aos demais estudos (Da Costa Filho et al., 2021). Contudo, três estudos utilizaram metodologia semelhante em relação ao método digestivo (aquecimento do leite) e à porosidade do filtro (10 e 11  $\mu\text{m}$ ), e um deles apresentou quantidade de MPs significativamente superior

comparando aos outros dois (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Kiruba et al., 2020; Basaran et al., 2023). Além dos fatores previamente citados que podem interferir nos resultados obtidos, as condições laboratoriais para a execução da técnica também são cruciais, uma vez que a contaminação das amostras ao longo da técnica gera resultados falso positivos, impactando a interpretação dos resultados. Todavia, os três estudos citam medidas semelhantes de prevenção de contaminação, que são fortemente indicados nos procedimentos de análise de MPs, como a realização da técnica em área restrita e com baixa circulação de pessoas, uso de capela de exaustão desligada, limpeza da superfície e uso de jaleco de algodão (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Kiruba et al., 2020; Basaran et al., 2023).

É crucial considerar a possível origem dos MPs nas amostras analisadas, pois partículas maiores provavelmente se originam das embalagens ou do processo tecnológico pelo qual o leite passa, em vez de serem secretadas junto com o leite na glândula mamária. Estudos apontam que, para que os MPs sejam translocados no organismo através de membranas celulares e eliminados no leite, é necessário que essas partículas não excedam 15  $\mu\text{m}$ , e que essa movimentação de MPs depende de células do sistema imune e/ou células epiteliais (Alimba et al., 2021; Ragusa et al., 2022). Independentemente da via de contaminação do leite por MPs, o tamanho das partículas é elemento essencial para que isso ocorra, seja por endocitose nas células epiteliais, seja por difusão passiva (Hallet, 2020; Enyoh et al., 2023). Isso é corroborado pelos resultados de Ragusa e colaboradores, que detectaram MPs em leite materno vindo diretamente da glândula mamária em tamanhos entre 2 e 12  $\mu\text{m}$  (Ragusa et al., 2022).

#### *2.6.1.1.1 Fatores que influenciam a quantidade de microplásticos em leite*

Alguns fatores atrelados à produção e processamento do leite de consumo devem ser levados em consideração ao comparar resultados de estudos relacionados à essa matriz. No Brasil a produção de leite é uma atividade amplamente disseminada por todo o território nacional, sendo que, inicialmente, os sistemas de produção eram majoritariamente extensivos, baseados no uso de pastagens pouco produtivas e de baixo valor nutricional. No entanto, a intensificação da produção, especialmente em regiões de clima tropical, tem se mostrado uma estratégia eficaz para aumentar a produtividade e a lucratividade da atividade leiteira (Paciullo &

Gomide,2016; Martha Junior et al., 2012).

Nos sistemas intensivos, onde se incluem a suplementação alimentar e a ensilagem do milho como práticas comuns, observam-se maiores investimentos em infraestrutura e insumos, como concentrados e fertilizantes nitrogenados, representando uma parcela significativa dos custos de produção (Ferreira et al., 2016). Esses sistemas visam maximizar a eficiência produtiva, mas podem implicar em maior contato dos animais com materiais plásticos, presentes em diversas etapas do manejo e armazenamento. Por outro lado, nos sistemas extensivos, embora haja menor intervenção humana e menor uso de insumos, a exposição dos animais a materiais plásticos tende a ser mais limitada, refletindo-se em menor impacto potencial dos plásticos na cadeia produtiva do leite. O uso do plástico nos sistemas pecuários intensivos pode ser observado, por exemplo, nos filmes plásticos para envolvimento de materiais como o feno e ensilagem ofertados aos animais, por facilitar o transporte, permitir a conservação e a organização para empilhamento e armazenamento (Andrady & Neal, 2009; Scarascia-Mugnozza et al., 2011; Liu et al., 2014). Outra fonte de contaminação são as rações peletizadas, que eventualmente podem incluir fragmentos de plástico advindos de embalagens. No Reino Unido esse problema vem sendo remediado pelo estabelecimento de um limite de detecção desses contaminantes plásticos na faixa de 0,15% por peso de ração para o gado (Parfitt et al., 2015).

Além disso, Pause e colaboradores (2024) citam o contato dos ruminantes com partículas plásticas ao longo da vida produtiva em sistema intensivo diretamente nos solos de pastagens, pelo uso de materiais plásticos para estufas ou túneis, tanques e tubos de irrigação, lodo de esgoto, bio-sólidos, fertilizantes e água contaminada que são rotineiramente aplicados no campo (Zhu et al., 2019; Wang et al., 2020). Ainda, fragmentos dos pneus de tratores e outros veículos que circulam pelas propriedades ou estradas próximas também podem contaminar o solo com MPs. As partículas de menor tamanho podem ser absorvidas pelas raízes de plantas, ou se aderirem externamente às folhas, possibilitando a ingestão pelos animais no pasto (Pause et al., 2024; Li et al., 2023). As consequências dessas interações podem ser notadas em estudos que relatam plásticos no trato digestivo dos animais, como realizado por Meyer e colaboradores (2023) ao observarem 30% de bovinos afetados principalmente por fibras de rede usadas em fardos de feno, e fragmentos de filmes plásticos usados na conservação da ensilagem.

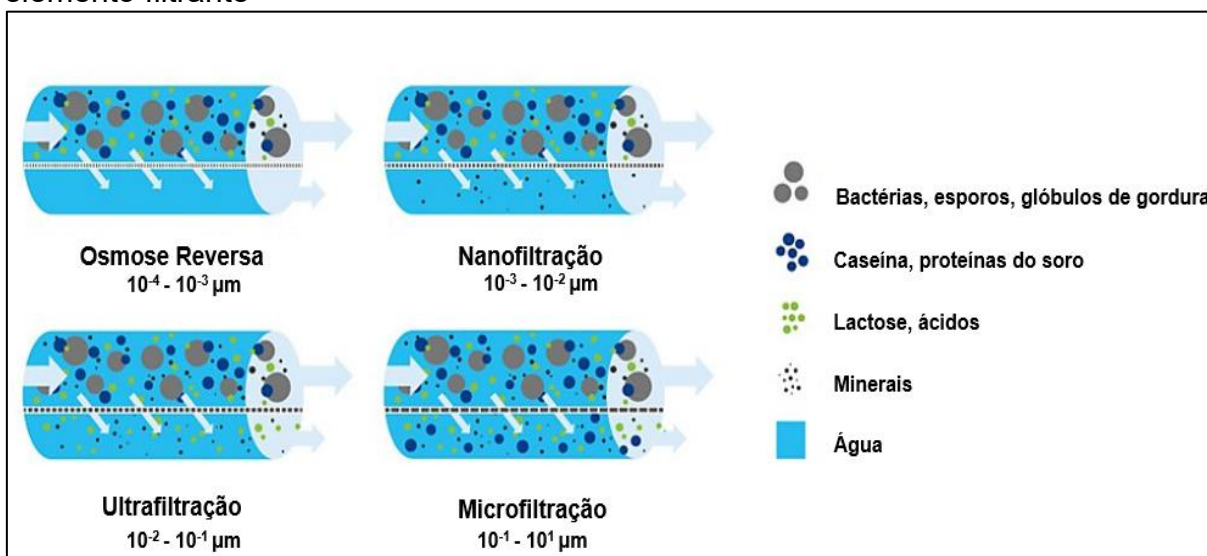
Todas essas fontes de partículas plásticas podem interagir com os animais por via aérea ou via ingestão, podendo alcançar a glândula mamária ao atravessarem a barreira sangue-leite, mas a translocação de MPs e nanoplásticos para o leite ainda precisa ser mais profundamente elucidada (Dong et al., 2023). Ragusa e colaboradores (2022) citam que, até então, são apontadas duas vias hipotéticas para a translocação de partículas do sangue para o leite. Uma é a via dependente de células epiteliais mamárias, e a outra é dependente de células imunológicas, sendo esta mais relevante no caso de partículas inaladas. De maneira geral, discute-se que partículas principalmente  $\leq 10 \mu\text{m}$  são potencialmente capazes de acessar qualquer região do organismo e passar por membranas celulares e barreiras (Prata et al., 2020; Barceló et al., 2023).

Ainda que o leite cru possa carregar MPs vindos da glândula mamária dos animais ou do contato com materiais plásticos dos componentes de ordenha, a filtração é um procedimento amplamente empregado no processamento desse alimento. Desde a fazenda o leite passa por filtros para a retenção de impurezas grosseiras, e na chegada aos laticínios é obrigatória a filtração mediante passagem sob pressão por material filtrante apropriado, antes de qualquer operação de pré-beneficiamento ou beneficiamento (BRASIL, 2017). A legislação brasileira, no entanto, não define tamanho mínimo da malha do elemento filtrante.

Em relação à essa etapa, o leite pode ser submetido a diferentes processos de filtração industrial, como a ultrafiltração e a microfiltração, cujos poros variam de tamanho conforme o que se deseja reter e em qual proporção (Figura 3). A composição desses filtros também varia, sendo geralmente constituídos por materiais poliméricos ou misturas de polímeros (celulose, algodão, viscosa e poliéster), cerâmicos ou de aço inoxidável. Os filtros de microfiltração são projetados para reter partículas indesejadas, como bactérias, esporos, células somáticas e impurezas, enquanto os de ultrafiltração são frequentemente usados para concentrar proteína e, ao mesmo tempo, reduzir açúcares e a lactose no permeado (Da Costa Filho et al., 2021). Além da microfiltração e ultrafiltração, outros dois procedimentos podem ser aplicados na indústria de laticínios para retenção de outras frações do leite. A nanofiltração é capaz de reter alguns sais minerais, e a osmose reversa é utilizada para separar os sólidos totais (Malik et al., 2013).

**Figura 3** – Processos de filtração aplicados em indústrias de laticínios e quais componentes do leite são retidos em cada caso, a depender do tamanho da malha do

elemento filtrante



**Fonte:** adaptado de Malik et al. (2013) e Tetrapak - Processos de filtração

No entanto, é importante destacar que os filtros compostos por polímeros plásticos são apontados também como fontes de MPs e nanoplásticos para o leite, apesar de também acabarem retendo diversos MPs maiores (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Prata & Dias-Pereira, 2023). Portanto, são diversas as fontes de origem de MPs no leite, havendo a necessidade de explorar cada etapa em diferentes localidades, visto que os sistemas de produção também podem impactar nos tipos e quantidades de partículas encontradas.

### 2.6.2 Métodos Utilizados Para Isolamento e Identificação de Microplásticos em Alimentos

A padronização da técnica de isolamento de MPs é desafiadora devido à diversidade de composição das matrizes analisadas. De forma geral, as técnicas desenvolvidas nos estudos envolvem a digestão da amostra, filtração, identificação das partículas, e considerações de garantia e controle de qualidade dos procedimentos (Bai et al., 2022). Alimentos sólidos, como os frutos do mar e produtos cárneos, por exemplo, requerem a dissecação do músculo dos animais com o auxílio de um microscópio estereoscópico, e as partículas identificadas são transferidas para uma placa de Petri para posterior contagem e identificação espectroscópica (Conesa e Iñiguez, 2020). A análise desses tipos de alimentos ricos em polímeros naturais geralmente requer tratamentos digestivos complexos, envolvendo compostos ácidos, alcalinos e/ou oxidativos (Habib et al., 2022; Mistri et al., 2022; Yozukmaz, 2022). Em

contrapartida, análises de soluções líquidas envolvem etapas mais simples, como é o caso da dissolução de sal marinho em água ultrapura (Kim et al., 2018; Yang et al., 2015).

Em relação à digestão da matéria orgânica, o hidróxido de potássio (KOH) é o composto mais frequentemente empregado nos estudos em frutos do mar, além do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido nítrico ( $HNO_3$ ). Outros alimentos geralmente são tratados com  $H_2O_2$ , havendo menos relatos do uso de  $HNO_3$ , KOH, hidróxido de sódio (NaOH) e enzimas (Bai et al., 2022). A digestão é uma etapa de extrema importância na técnica de isolamento de MPs em matrizes ricas em matéria orgânica, pois, além de viabilizar a filtração com menor oclusão dos filtros, reduz a interferência nas etapas de identificação. A eficiência do corante Vermelho do Nilo, por exemplo, é afetada pela presença de matéria orgânica na amostra, já que, além de corar os MPs, também pode aderir a gorduras, sabões e géis formados durante a digestão (Prata et al., 2021). Em termos de filtração, etapa geralmente empregada para o isolamento dos MPs do restante da amostra, a melhor opção para alimentos que não apresentem matéria orgânica em abundância são os filtros de porosidades menores. As membranas de porosidade  $<10 \mu m$  são as mais empregadas em análises de MPs em amostras de alimentos (Bai et al., 2022).

Na sequência, a identificação dos MPs costuma envolver a análise visual por microscopia e métodos espectroscópicos para acessar informações como a cor, formato, tamanho e composição das partículas. Os estudos combinam diferentes métodos, sendo frequentemente empregadas a microscopia óptica e de fluorescência, análises espectroscópicas Raman e FTIR. Adicionalmente, técnicas como a microscopia eletrônica de varredura permitem uma melhor visualização morfológica das partículas, permitindo analisar detalhes, como desgastes das bordas e das superfícies, possibilitado inferir o quão envelhecidas estão. Ainda, o método de microscopia eletrônica de varredura associado à espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (SEM-EDX) pode fornecer informações sobre a composição química das partículas. Essa técnica mede a concentração de elementos na amostra por meio da emissão de raios-X característicos, gerada quando os elétrons primários causam ionização nos átomos da amostra. Esse processo provoca a excitação na eletrosfera ao remover elétrons de orbitais internos, o que resulta na emissão de fótons específicos para cada elemento, permitindo a identificação por meio de “linhas” espectrais (Reed, 1993; Goldstein et al., 2007; Vasconcellos e Hinrichs, 2014). A

quantificação dos elementos ocorre pela análise da intensidade dessas linhas, porém, para garantir precisão, alguns fatores devem ser considerados. Como destaca Maliska (2005), a espécie deve ser homogênea em todo o volume de interação, ou seja, filmes ou precipitados atrapalham o posicionamento do feixe de elétrons. Além disso, a amostra deve ter superfície polida e estar posicionada num ângulo conhecido em relação ao feixe de elétrons e ao espectrômetro. Por fim, a amostra não deve sofrer polimento ou ataque químico, pois isso pode impossibilitar a caracterização dos constituintes da região superficial (Maliska, 2005).

Devido às possibilidades analíticas abordadas acima, o SEM-EDX é um método frequentemente empregado em estudos sobre MPs (Gniadek e Dąbrowska, 2019; Da Costa Filho et al., 2021; Karami et al., 2017; Shruti et al., 2020). Por fim, é essencial que todas as técnicas de isolamento e identificação de MPs incluam os parâmetros de garantia e controle de qualidade, a fim de minimizar a inclusão de MPs ambientais nas amostras, gerando resultados falso-positivos. As etapas envolvidas no isolamento devem ser executadas em cabines de fluxo laminar limpas com álcool 70%, e os reagentes utilizados devem ser filtrados antes do uso, além da indicação do uso de jalecos de algodão e a manipulação mais ágil possível das amostras (Bai et al., 2022; Prata et al., 2021).

## 2.6.2.1 Métodos relatados em estudos sobre Microplásticos em leite

### 2.6.2.1.1 *Tratamentos digestivos pré-filtração*

O alto valor nutricional do leite está relacionado à sua composição rica, abrangendo proteínas, carboidratos e gordura. No Brasil, o leite é categorizado como integral, quando contém no mínimo 3% (m/m) de gordura; semidesnatado, com teor de gordura entre 0,6 a 2,9% (m/m); ou desnatado, apresentando, no máximo, 0,5% (m/m) de gordura (Brasil, 2018). A legislação brasileira também estabelece requisitos para o teor de proteína (mínimo de 2,9% m/m), lactose (mínimo de 4,3% m/m) e teor mínimo de sólidos totais (11,4% m/m) (Brasil, 2018). Portanto, o isolamento de MPs nessa matriz alimentícia requer um tratamento digestivo pré-filtração, reduzindo a oclusão do filtro e a interferência na identificação das partículas (Prata et al., 2021).

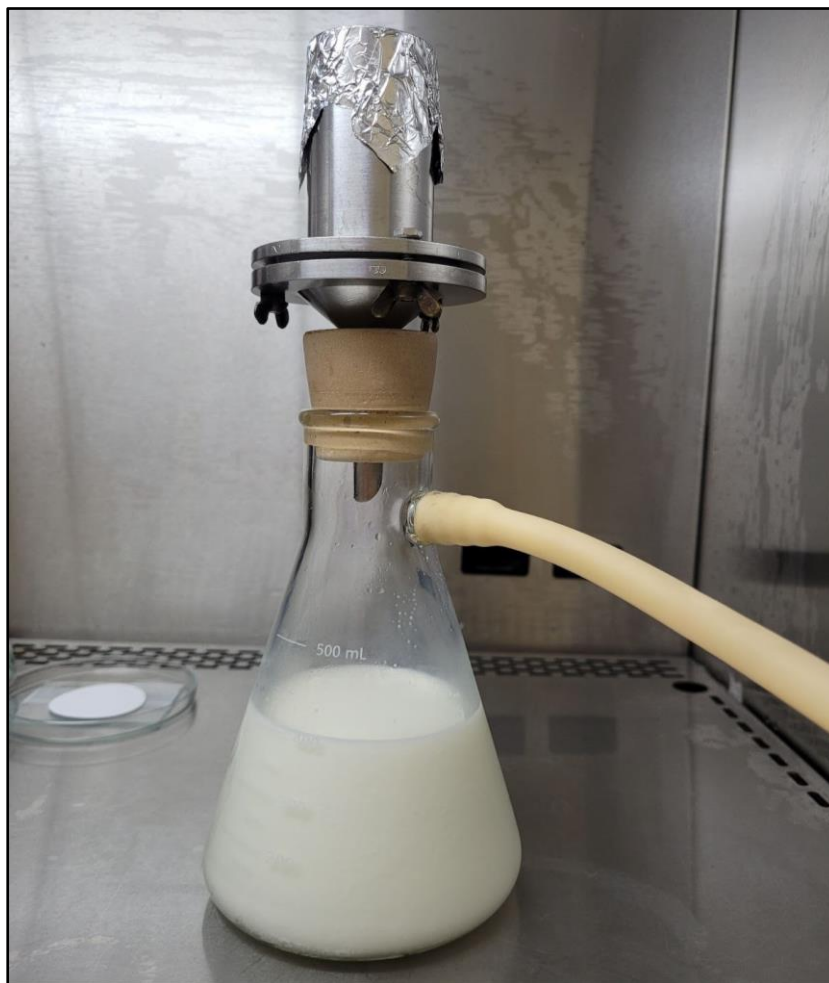
Cientistas que investigaram MPs no leite relataram diferentes

tratamentos pré-filtração, como o aquecimento da bebida (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Kiruba et al., 2022; Basaran et al., 2023), digestão alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH 25%), associada ao aquecimento e digestão multienzimática (Da Costa Filho et al., 2021), digestão oxidativa com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Diaz-Basantes et al., 2020) e simulação da digestão humana (combinação entre os componentes do suco gástrico e suco pancreático) (Zhang et al., 2023). A digestão da matriz pode causar danos aos MPs, provocando alterações na cor, formato, superfície e tamanho das partículas (Savino et al., 2022). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicado em altas concentrações e altas temperaturas, por exemplo, pode provocar alterações em PA e PP (Hurley et al., 2018); enquanto o HNO<sub>3</sub> pode gerar danos ao PS, à PA e ao PE (Campanale et al., 2020; Naidoo et al., 2017; Stock et al., 2019).

#### 2.6.2.1.2 Filtração a vácuo

A filtração a vácuo é o método mais simples para o isolamento de MPs, vastamente utilizado nas análises de alimentos (Conesa e Iñiguez, 2020). A unidade de filtração (Figura 4) denominada frasco de Buchner é comumente empregada na investigação de MPs (Ramamany e Harit, 2023). Todos os estudos que analisaram MPs no leite reportam o isolamento das partículas por filtração, com variação no material do filtro utilizado e o tamanho do poro. Filtros de celulose (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Kiruba et al., 2022; Basaran et al., 2023), silicone (Da Costa Filho et al., 2021), nylon (Diaz-Basantes et al., 2020) e policarbonato (Zhang et al., 2023) foram relatados, e os tamanhos dos poros selecionados variaram entre 5 e 11 µm.

**Figura 4** - Frasco de Buchner utilizado na filtração à vácuo do leite para isolamento de MPs



Fonte: a própria autora (2023)

### 2.6.2.1.3 *Visualização microscópica (microscopia óptica e microscopia de fluorescência)*

A visualização por microscopia óptica é utilizada em diversos estudos de MPs como uma análise preliminar sobre formatos e cores das partículas, sendo combinada a outros métodos que permitam acessar informações mais detalhadas sobre as propriedades dos possíveis MPs detectados. Por ser um método subjetivo, falhas na identificação podem ocorrer, uma vez que resquícios de matéria orgânica e inorgânica podem ser facilmente confundidos com MPs, e partículas muito pequenas podem não ser detectadas, gerando resultados falsos positivos ou negativos (Prata et al., 2021; Gniadek e Dąbrowska, 2019). Para reduzir esses erros, Kutralam-Muniasamy e colaboradores (2020), consideraram como MPs as partículas que mantiveram a forma ou se esticaram quando esfregadas ou pressionadas com uma pinça de metal, ao contrário da matéria orgânica que geralmente se quebra. A

combinação desse método a outros mais objetivos, como a identificação visual com o corante Vermelho do Nilo, técnicas espectroscópicas (Raman; FTIR) e microscopia eletrônica associada à espectroscopia de raios-X (SEM-EDX), fornece resultados mais precisos (Prata et al., 2021; Gniadek e Dąbrowska, 2019).

Até o momento, não há relatos da identificação de MPs por microscopia de fluorescência associada ao uso do corante lipofílico Vermelho do Nilo, uma importante ferramenta para os estudos da área, considerada uma análise de baixo custo. A aplicação do Vermelho do Nilo aprimora a técnica, pois gera fluorescência em MPs visualizados em comprimentos de onda entre 365 a 510 nm. No entanto, resquícios de matéria orgânica podem gerar fluorescência da mesma forma, resultando em resultados falsos positivos (Conesa e Iñiguez, 2020). Por essa razão, Erni-Cassola e colaboradores (2017), reforçam a necessidade de remoção da matéria orgânica para o uso do Vermelho do Nilo nessa etapa da técnica, que realizada adequadamente permite a detecção de pequenos MPs ( $\geq 2 \mu\text{m}$ ).

A visualização microscópica geralmente é sucedida por análises das imagens capturadas por softwares capazes de gerar medições das partículas, como o ImageJ ou similares (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Basaran et al., 2023).

#### *2.6.2.1.4 Visualização por microscopia eletrônica associada à espectroscopia de raios-X (SEM-EDX)*

A análise das partículas por SEM-EDX revela maiores detalhes da superfície, formato e efeitos do envelhecimento, além da composição química dos materiais. As amostras triadas pela microscopia óptica podem ser transferidas para o microscópio eletrônico de varredura para esses fins (Gniadek e Dąbrowska, 2019). Acerca dos estudos de MPs em leite, dois dos seis estudos disponíveis até o momento utilizaram essa ferramenta (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Da Costa Filho et al., 2021).

#### *2.6.2.1.5 Técnicas espectroscópicas*

As técnicas espectroscópicas confirmam a natureza sintética das partículas observadas. Essas análises geram os espectros dos polímeros que compõem os plásticos, identificando MPs de cerca de 1  $\mu\text{m}$  através de um laser (Raman), ou MPs de cerca de 20  $\mu\text{m}$  pela interação entre a matéria e a radiação infravermelha ( $\mu$ -FT-IR) de acordo com bibliotecas de espectros (Ramassamy e Harit, 2023). Os autores dos estudos de MPs em leite usaram, em sua maioria, a técnica FT-IR (Diaz-Basantes et al., 2020; Kiruba et al., 2022; Basaran et al., 2023; Zhang et al., 2023), com dois estudos reportando o uso da técnica Raman (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Da Costa Filho et al., 2021).

### 3 REFERÊNCIAS

ADEOGUN, A.O., IBOR, O.R., KHAN, E.A., CHUKWUKA, A.V., OMOGBEMI, E.D. Detection and occurrence of microplastics in the stomach of commercial fish species from a municipal water supply lake in southwestern Nigeria. **Environmental Science and Pollution Research**, v.27, n. 2020, p. 31035–31045, mai 2020.

ALHARBI, O., BASHEER, A.A., KHATTAB, R.A., ALI, I. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. **Journal of Molecular Liquids**, v. 263, p. 442-453, ago 2018.

ALIMBA, C.G., FAGGIO, C., SIVANESAN, S., OGUNKANMI, A.L., KRISHNAMURTHI, K. Micro(nano)-plastics in the environment and risk of carcinogenesis: Insight into possible mechanisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, n.126143, ago 2021.

AL-SALEM, S.M., BAEYENS, P.L.J. Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): A review. **Waste Management**, v. 29, n. 10, p. 2625-2643, out 2009.

AMATO-LOURENÇO, L.F., CARVALHO-OLIVEIRA, R., RIBEIRO JÚNIOR, G., GALVÃO, L.S., ANDO, R.A., MAUAD, T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, ago 2021.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM D883-17. **Standard terminology relating to plastics**, ASTM International, West Conshohocken, PA, p. 1-16, 2017.

AN, L., LIU, Q., DENG, Y., WU, W., GAO, Y., LING, W. Sources of Microplastic in the Environment. *In*: HE, D., LUO, Y. **Microplastics in Terrestrial Environments: Emerging Contaminants and Major Challenges**. Berlim: Springer, 2020. p.143–159.

ANDRADE, M. C., WINEMILLER, K. O., BARBOSA, P. S., FORTUNATI, A., CHELAZZI, D., CINCINELLI, A., & GIARRIZZO, T. First account of plastic pollution impacting freshwater fishes in the Amazon: Ingestion of plastic debris by piranhas and other serrasalmids with diverse feeding habits. **Environmental Pollution**, v. 244, p. 766–773, 2019.

ANDRADY, A.L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**,

v. 62, n. 8, p. 1596-1605, ago 2011.

ANDRADY, A.L., NEAL, M.A. Applications and societal benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.364, n.1526, p.1977-1984, jul 2009.

ANDRETTA, M., CALL, D.R., NERO, L.A. Insights into antibiotic use in Brazilian dairy production. **International Journal of Dairy Technology**, v. 76, n. 1, p. 28-37, fev 2023.

ARTHUR, C., J. BAKER, H. BAMFORD.2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris. Tacoma: **Technical Memorandum NOS-OR&R-30**, 2008.

ATUGODA, T., VITHANAGE, M., WIJESEKARA, H., BOLAN, N., SARMAH, A.K., BANK, M.S., YOU, S., OK, Y.S. Interactions between microplastics, pharmaceuticals and personal care products: Implications for vector transport. **Environment International**, v. 149, n. 2021, p. 1-21, abr 2021.

BAHL, S., DOLMA, J., SINGH, JYOT, SEHGAL, S. Biodegradation of plastics: A state of the art review. **Materials Today: Proceedings**, v. 39, n. 2021, p. 31-34, jul 2021.

BAI, C.L., LIU, L.Y., HU, Y.B., ZENG, E.Y., GUO, Y. Microplastics: A review of analytical methods, occurrence and characteristics in food, and potential toxicities to biota. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 1-13, fev 2022.

BARCELÓ, D., PICÓ, Y., ALFARHAN, A.H. Microplastics: Detection in human samples, cell line studies, and health impacts. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.101, n.104204, p.1-16, ago 2023.

BASARAN, B., ÖZÇİFÇİ, Z., AKCAY, H.T., AYTAN, Ü. Microplastics in branded milk: Dietary exposure and risk assessment. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 123, n. 2023, p. 1-10, out 2023.

BERIOT, N., PEEK, J., ZORNOZA, R., GEISSEN, V., LWANGA, E.H. Low density-microplastics detected in sheep faeces and soil: A case study from the intensive vegetable farming in Southeast Spain. **Science of The Total Environment**, v. 755, n.

142653, p. 1-6, fev 2021.

BHAGAT, J., NISHIMURA, N., SHIMADA, Y. Toxicological interactions of microplastics/nanoplastics and environmental contaminants: Current knowledge and future perspectives. **Journal of Hazardous Materials**, v. 405, mar 2021.

BOND, T., FERRANDIZ-MAS, V., FELIPE-SOTELO, M., VAN SEBILLE, E. The occurrence and degradation of aquatic plastic litter based on polymer physicochemical properties: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 7-9, p. 685-722, ago 2018.

BORGES, D.G. Aproveitamento de Embalagens Cartonadas em Compósitos de Polietileno de Baixa Densidade. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – **Escola Politécnica, Universidade de São Paulo**, 2007.

BRADNEY, L., WIJESEKARA, H., PALANSOORIYA, K.N., OBADAMUDALIGE, N., BOLAN, N.S., OK, Y.S., RINKLEBE, J., KIM, K.H., KIRKHAM, M.B. Particulate plastics as a vector for toxic trace-element uptake by aquatic and terrestrial organisms and human health risk. **Environment International**, v. 131, n. 2019, p.1-18, out 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, instituídas pela Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e pela Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018**. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Brasília, 2018.

BROWNE, M. A., CRUMP, P., NIVEN, S. J., TEUTEN, E., TONKIN, A., GALLOWAY, T., THOMPSON, R. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: Sources and sinks. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 21, p. 9175–9179, 2011.

CABERNARD, L., ROSCHER, L., LORENZ, C., GERDTS, G., PRIMPKE, S. Comparison of Raman and Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the

Quantification of Microplastics in the Aquatic Environment. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 22, p. 13279–13288, out 2018.

CAMPANALE, C., SAVINO, I., POJAR, I., MASSARELLI, C., URICCHIO, V.F. A Practical Overview of Methodologies for Sampling and Analysis of Microplastics in Riverine Environments. **Sustainability**, v.12, n. 17, p. 1-29, ago 2020.

COLTON, J. B., BURNS, B. R., KNAPP, F. D. Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic. **Science**, v. 185, n. 4150, p. 491–497, ago 1974.

CONESA, J.A., IÑIGUEZ, M.E. Analysis of Microplastics in Food Samples. *In*: ROCHA-SANTOS, T., COSTA, M., MOUNEYRAC, C. **Handbook of Microplastics in the Environment**. 2<sup>nd</sup> edition. Berlim: Springer, 2020. p. 1-16.

CONTI, G.O., FERRANTEA, M., BANNIB, M., FAVARA, C., NICOLOSI, I., CRISTALDI, A., FIORE, M., ZUCCARELLO, P. Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. **Environmental Research**, v. 187, n. 2020, p. 1-7, ago 2020.

CORCORAN, P.L. Degradation of Microplastics in the Environment. *In*: ROCHA-SANTOS, T., COSTA, M.F., MOUNEYRAC, C. **Handbook of Microplastics in the Environment**. 2<sup>nd</sup> edition. Berlim: Springer, 2022. p. 531-542.

COX, K.D., A., G., HAILEY, C., DAVIES L., DOWER, J.F., JUANES, F., DUDAS, S.E. Human Consumption of Microplastics. **Environmental Science & Technology**, v.53, n.1, p. 7068-7074, jun 2019.

DA COSTA FILHO, P.A., ANDREY, D., ERIKSEN, B. et al. Detection and characterization of small-sized microplastics ( $\geq 5 \mu\text{m}$ ) in milk products. **Scientific Reports**, v. 11, n. 24046, dez 2021.

DAY, R.H., SHAW, D.G. Patterns in the abundance of pelagic plastic and tar in the north Pacific Ocean, 1976–1985. **Marine Pollution Bulletin**, v. 18, n. 6, p. 311-316, jun 1987.

DIAZ-BASANTES, M.F., CONESA, J.A., FULLANA, A. Microplastics in Honey, Beer, Milk and Refreshments in Ecuador as Emerging Contaminants. **Sustainability**, v. 12,

n. 14, p. 1-17, mai 2020.

DE FALCO, F., DI PACE, E., COCCA, M.C., AVELLA, M. The contribution of washing processes of synthetic clothes to microplastic pollution. **Scientific Reports**, v. 9, n. 6633, p. 1-11, abr 2019.

DENKER, B.M., NIGAM, S.K. Molecular structure and assembly of the tight junction. **American Physiological Society Journal**, v. 274, p. 1–9, 1998.

DOMENECH, J., MARCOS, R. Pathways of human exposure to microplastics, and estimation of the total burden. **Current Opinion in Food Science**, v. 39, p. 144–151, jan 2021.

DONG, X., LIU, X., HOU, Q., WA, Z. From natural environment to animal tissues: A review of microplastics(nanoplastics) translocation and hazards studies. **Science of The Total Environment**, v.855, n.158686, jan 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Cresce o consumo de lácteos no Brasil. In: **Anuário do Leite 2020**, p. 33–34, 2020.

ENYOH, C.E., DEVI, A., KADONO, H., WANG, Q., RABIN, M.H. The Plastic Within: Microplastics Invading Human Organs and Bodily Fluids Systems. **Environments**, v.10, n. 11, nov 2023.

ERNI-CASSOLA, G., GIBSON, M.I., THOMPSON, R.C., CHRISTIE-OLEZA, J.A. Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20  $\mu$ m) in Environmental Samples. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 23, p. 13641-13648, nov 2017.

FERREIRA, G. V. B., BARLETTA, M., LIMA, A. R. A., DANTAS, D. V., JUSTINO, A. K. S., COSTA, M. F. Plastic debris contamination in the life cycle of Acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*) in a tropical estuary. **Ices Journal of Marine Science**, v. 73, n. 10, p. 2695–2707, 2016.

FERREIRA, R.P., VILELA, D., TUPY, O., COMERON, E.A., BASIGALUP, D.H., BERNARDI, A.C.C., KUWAHARA, F.A., KARAM, D. Potencial forrageiro da alfafa para alimentação de vacas de leite nos trópicos. In: VILELA, D., FERREIRA, R.P.,

FERNANDES, E.N., JUNTOLLI, F.V. **Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa, 2016. p.167-186.

FORD, H.V., JONES, N.H., DAVIES, A.J., GODLEY, B.J., JAMBECK, J.R., NAPPER, I.E., SUCKLING, C.C., WILLIAMS, G., J., WOODALL, L.C., KOLDEWEY, H.J. The fundamental links between climate change and marine plastic pollution. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 1-11, fev 2022.

FULLER, S., GAUTAM, A. A procedure for measuring microplastics using pressurized fluid extraction. *Environmental Science and Technology*, v. 11, p. 5774–5780, 2016.

GALL, S.C., THOMPSON, R.C. The impact of debris on marine life. **Marine Pollution Bulletin**, v. 92, n. 1–2, p.170-179, mar 2015.

GALLOWAY, T.S. Micro- and Nano-plastics and Human Health. *In*: BERGMANN, M, GUTOW, L, KLAGES, M. **Marine Anthropogenic Litter**. Berlim: Springer, 2015. p. 343–366.

GAN, Q., CUI, J., JIN, B. Environmental microplastics: Classification, sources, fates, and effects on plants. **Chemosphere**, v. 313, n.137559, fev 2023.

GASTON, E.; WOO, M.; STEELE, C.; SUKUMARAN, S.; ANDERSON, S. Microplastics Differ Between Indoor and Outdoor Air Masses: Insights from Multiple Microscopy Methodologies. **Society for Applied Spectroscopy**, v. 74, n. 9, abr 2020.

GEYER, R. A brief history of plastic. *In*: BIANCHI, M.S.; CIMADEVILA, M., TRETTNAK, W. **Mare Plasticum: The Plastic Sea**. 1st edition. Berlim: Springer, 2020. p. 31–47.

GEYER, R., JAMBECK, J.R., LAW, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. 1-5, jul 2017.

GEYER, R. Production, use, and fate of synthetic polymers. *In*: LETCHER, T.M. **Plastic Waste and Recycling**. 1st edition. Cambridge: Academic Press, 2020. p. 13-32.

GNIADK, M., DĄBROWSKA, A. The marine nano- and microplastics characterisation by SEM-EDX: The potential of the method in comparison with various physical and

chemical approaches. **Marine Pollution Bulletin**, v. 148, p. 210-216, nov 2019.

GOLDSTEIN, J.I.; NEWBURY, D.E.; JOY, D.; LYMAN, C.; ECHLIN, P.; LIFSHIN, E.; SAWYER, L.; MICHAEL, J. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. Springer, New York, 2007.

GUART, A.; BONO-BLAY, F.; BORRELL, A.; LACORTE, S. Migration of plasticizersphthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 5, p. 676–685, mar 2011.

GUILLEN, J., NATALE, F., CARVALHO, N., CASEY, J., HOFHERR, J., DRUON, J.N., FIORE, G., GIBIN, M., ZANZI, A., MARTINSOHN, J.T. Global seafood consumption footprint. **Ambio**, v. 48, p. 111-122, 2019.

GUO, X., WANG, J. Sorption of antibiotics onto aged microplastics in freshwater and seawater. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, n. 2019, p. 1-9, dez 2019.

GUZZETTI, E., SUREDA, A., TEJADA, S., FAGGIO, C. Microplastic in marine organism: Environmental and toxicological effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 64, n. 2018, p.164-171, dez 2018.

HABIB, R.Z., AL KINDI, R., AL SALEM, F., KITTANEH, W.F., POULOSE, V., IFTIKHAR, S.H., MOURAD, A.H.I., THIEMANN, T. Microplastic Contamination of Chicken Meat and Fish through Plastic Cutting Boards. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19. n. 20, p. 1-13, out 2022.

HALLETT, M.B. An Introduction to Phagocytosis. *In*: HALLET, M.B. **Molecular and Cellular Biology of Phagocytosis**.1st edition. Springer, Cham, 2020. p. 1-7.

HAUSFATHER, Z. **Will 2023 be the first year above 1.5°C?** Disponível em: <https://berkeleyearth.org/will-2023-be-the-first-year-above-1-5c/>. Acesso em: 01 dez. 2023.

HENRY, B., LAITALA, K., KLEPP, I.G. Microfibres from apparel and home textiles: Prospects for including microplastics in environmental sustainability assessment. **Science of The Total Environment**, v. 652, p. 483-494, fev 2019.

HORTON, A.A., WALTON, A., SPURGEON, D.J., LAHIVE, E., SVENDSEN, C. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 127-141, mai 2017.

HU, L., ZHAO, Y., XU, H. Trojan horse in the intestine: A review on the biotoxicity of microplastics combined environmental contaminants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 439, p. 1-19, out 2022.

HURLEY, R.R., LUSHER, A.L., OLSEN, M., NIZZETTO, L. Validation of a Method for Extracting Microplastics from Complex, Organic-Rich, Environmental Matrices. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 13, p. 7409–7417, 2018.

IÑIGUEZ, M.E., CONESA, J.A., FULLANA, A. Microplastics in Spanish Table Salt. **Scientific Reports**, v. 7, n. 8620, p.1-7, ago 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: IBGE, 2015.

JAMBECK, J.R., GEYER, R., WILCOX, C., SIEGLER, T.R., PERRYMAN, M., ANDRADY, A., NARAYAN, R., LAW, K.L. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768–771, fev 2015.

JADHAV, E.B., SANKHLA, M.S.S., BHAT, R.A., BHAGAT, D.S. Microplastics from food packaging: An overview of human consumption, health threats, and alternative solutions. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 16, dez 2021.

JAMIESON, A.J., BROOKS, L.S.R., REID, W.D.K., PIERTNEY S.B., NARAYANASWAMY, B.E., LINLEY, T.D. Microplastics and synthetic particles ingested by deep-sea amphipods in six of the deepest marine ecosystems on Earth. **Royal Society Open Science**, v. 6, p. 1-11, jan 2019.

JIN, M., WANG, X., REN, T., WANG, J., SHAN, J. Microplastics contamination in food and beverages: Direct exposure to humans. **Concise Reviews & Hypotheses In Food Science**, v. 86, p. 2816–2837, mai 2021.

JÖNSSON, C., ARTURIN, O.L., HANNING, A.C., LANDIN, R., HOLMSTRÖM, E., ROOS, S. Microplastics Shedding from Textiles—Developing Analytical Method for Measurement of Shed Material Representing Release during Domestic Washing. **Sustainability**, v. 10, n. 7, p. 1-17, jul 2018.

KARAMI, A., GOLIESKARDI, A., KEONG CHOO, C., LARAT, V., GALLOWAY, T.S., SALAMANTINIA, B. The presence of microplastics in commercial salts from different countries. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-9, abr 2017.

KATSUMITI, A., LOSADA-CARRILLO, M.P., BARROS, M., CAJARAVILLE, M.P. Polystyrene nanoplastics and microplastics can act as Trojan horse carriers of benzo(a)pyrene to mussel hemocytes in vitro. **Scientific Reports**, v.11, n. 22396, 2021.

KAZEMI, M., KABIR, S.F., FINI, E.H. State of the art in recycling waste thermoplastics and thermosets and their applications in construction. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 174, n. 105776, p. 1-20, nov 2021.

KIRUBA, R., PREETHI, M., AGANASTEEN, R., RAJ, R.M., THABITHA, H.C., MONICA, P., SAKTHIVEL, J., LEVINCE, C., BANU, N.I. Identification of Microplastics as Emerging Contaminant in Branded Milk of Tamil Nadu State, India. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, v. 11, n. 1, p. 181-187, jan-abr 2022.

KIM, J.S., LEE, H.J., KIM, S.K., KIM, H.J. Global pattern of microplastics (MPs) in commercial food-grade salts: sea salt as an indicator of seawater MP pollution. **Environmental Science and Technology**, v. 52, p. 12819-12828, 2018.

KOSUTH, M., MASON, S.A., WATTENBERG, E.V. Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. **PLoS One**, v.13, p. 1-18, abr 2018.

KUMAR, A. Global Warming, Climate Change and Greenhouse Gas Mitigation. *In*: KUMAR, A., OGITA, S., YAU, Y.Y. **Biofuels: Greenhouse Gas Mitigation and Global Warming**. Springer, 2018, p. 1-16.

KUTRALAM-MUNIASAMY, G., PÉREZ-GUEVARA, F., ELIZALDE-MARTÍNEZ, I., SHRUTI, V.C. Branded milks – Are they immune from microplastics contamination? **Science of The Total Environment**, v. 714, n. 2020, p.1-10, abr 2020.

LAMBERT, S., WAGNER, M. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. **Chemosphere**, v. 145, p. 265–268, 2016.

LEE, H., KUNZ, A., SHIM, W.J., WALTHER, B.A. Microplastic contamination of table salts from Taiwan, including a global review. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-9, jul 2019.

LENZ, R., ENDERS, K., STEDMON, C.A., MACKENZIE, D.M.A., NIELSEN, T.G. A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. **Marine Pollution Bulletin**, v. 100, n. 1, p. 82-9, nov 2015.

LI, H., CHANG, X., ZHANG, J., WANG, Y., ZHONG, R., WANG, L., WEI, J., WANG, Y. Uptake and distribution of microplastics of different particle sizes in maize (*Zea mays*) seedling roots. **Chemosphere**, v.313, n.137491, p.1-9, fev 2023.

LIU, E.K., HE, W.Q., YAN, C.R.Y. 'White revolution' to 'white pollution'— agricultural plastic film mulch in China. **Environmental Research Letters**, v.9, n.9, p.1-3 , set 2014.

LOHMANN, R. Microplastics are not important for the cycling and bioaccumulation of organic pollutants in the oceans-but should microplastics be considered POPs themselves? **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 13, n. 3, p. 460–465, 2017.

LU, K., QIAO, R., AN, H., ZHANG, Y. Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 202, n. 2018, p. 514-520, jul 2018.

LUQMAN, A., NUGRAHAPRAJA, H., WAHYUONO, R.A., ISLAMI, I., HAEKAL, M.H., FARDIANSYAH, Y., PUTRI, B.Q., AMALLUDIN, F.I., ROFIQA, E.A., GÖTZ, F. Microplastic Contamination in Human Stools, Foods, and Drinking Water Associated with Indonesian Coastal Population. **Environments**, v. 8, n. 12, dez 2021.

MALIK, A.A., KOUR, H., BHAT, A., KAUL, R.K., KHAN, S., KHAN, S.U. Commercial Utilization of Membranes in Food Industry. **International Journal of Food Nutrition and Safety**, v.3, n.3, p.147-170, mai 2013.

MALISKA, A.M. Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise. **Apostila do Laboratório de Caracterização Microestrutural**. Universidade Federal de Santa Catarina. p.1-97, 2005.

MARTHA JUNIOR, G B., ALVES, E., CONTINI, E. Land-saving approaches and beef production growth in Brazil. **Agricultural Systems**, v.110, p. 173-177, jul 2012.

MEYER, G., PUIG-LOZANO, R., FERNÁNDEZ, A. Anthropogenic litter in terrestrial flora and fauna: Is the situation as bad as in the ocean? A field study in Southern Germany on five meadows and 150 ruminants in comparison with marine debris. **Environmental Pollution**, v.323, n.121304, p.1-14, abr 2023.

MISTRI, M., SFRISO, A.A., CASONI, E., NICOLI, M., VACCARO, C., MUNARI, C.M. Microplastic accumulation in commercial fish from the Adriatic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 174, n. 2022, p. 1-7, jan 2022.

MONTANO, L., GIORGINI, E., NOTARSTEFANO, V., NOTARI, T., RICCIARDI, M., PISCOPO, M., MOTTA, O. Raman Microspectroscopy evidence of microplastics in human semen. **Science of The Total Environment**, v. 901, nov 2023.

MOORE, C.J., MOORE, S.L., LEECASTER, M.K., WEISBERG, S.B. A Comparison of Plastic and Plankton in the North Pacific Central Gyre. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 12, p. 1297-1300, dez 2001.

MURPHY, F., EWINS, C., CARBONNIER, F., QUINN, B. Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 11, p. 5800–5808, 2016.

NAIDOO, T.; GOORDIYAL, K.; GLASSOM, D. Are Nitric Acid (HNO<sub>3</sub>) Digestions Efficient in Isolating Microplastics from Juvenile Fish? **Water Air Soil Pollution**, v. 228, n. 470, 2017.

NAKAT, Z., DGHEIM, N., BALLOUT, J., BOU-MITRI, C. Occurrence and exposure to microplastics in salt for human consumption, present on the Lebanese market. **Food Control**, v.145, n. 2023, p. 1-9, mar 2023.

NÄKKI, P., SETÄLÄ, O., LEHTINIEMI, M. Seafloor sediments as microplastic sinks in

the northern Baltic Sea—negligible upward transport of buried microplastics by bioturbation. *Environmental Pollution*, v. 249, p. 74–81, 2019.

NAPPER, I.E., THOMPSON, R.C. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: effects of fabric type and washing conditions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 112, n.1, p. 39–45, nov 2016.

NOTARDONATO, I. PROTANO, C., VITALI, M., BHATTACHARYA, B., AVINO, P. A Method Validation for Simultaneous Determination of Phthalates and Bisphenol A Released from Plastic Water Containers. **Applied Sciences**, v. 9, n. 14, 2019.

OLIVEIRA, T.A., OLIVEIRA, R.R., BARBOSA, R., AZEVEDO, J.B., ALVES, T.S. Effect of reprocessing cycles on the degradation of PP/PBAT-thermoplastic starch blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 52-60, jul 2017.

OLIVERI-CONTI, G., FERRANTE, M., BANNI, M., FAVARA, C., NICOLOSI, I., CRISTALDI, A., FIORE, M., ZUCCARELLO, P. Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. **Environmental Research**, v.187, p.1-7, mai 2020.

PACIULLO, D.S.C., GOMIDE, C.A.M. As contribuições de *Brachiaria* e *Panicum* para a pecuária leiteira. In: VILELA, D., FERREIRA, R.P., FERNANDES, E.N., JUNTOLLI, F.V. **Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa, 2016. p.167-186.

PARFITT, J., STANLEY, C., THOMPSON, L. WRAP: **Guidance for food and drink manufacturers and retailers on the use of food surplus as animal feed**. Banbury, UK: Anthesis, 2015.

PAUSE, F.C., URLI, S., CROCIATI, M., STRADAIOLI, G., BAUFELD, A. Connecting the Dots: Livestock Animals as Missing Links in the Chain of Microplastic Contamination and Human Health. **Animals**, v.14, n.2, p.1-19, jan 2024.

PEGADO, T. D. S. E. S., SCHMID, K., WINEMILLER, K. O., CHELAZZI, D., CINCINELLI, A., DEI, L., & GIARRIZZO, T. First evidence of microplastic ingestion by fishes from the Amazon River estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, p. 814–821, 2018.

PEÑALVER, R., ARROYO-MANZANARES, N., LOPEZ-GARCÍA, I., HERNANDEZ-CORDOBA, M. An overview of microplastics characterization by thermal analysis. **Chemosphere**, v. 242, n. 2020, p. 1-9, mar 2020.

PENG, X., CHEN, M., CHEN, S., DASGUPTA, S., XU, H., TA, K., DU, M., LI, J., GUO, Z., BA, S. Microplastics contaminate the deepest part of the world's ocean. **Geochemical Perspectives Letters**, v. 9, p. 1-5, nov 2018.

PINTO DA COSTA, J., AVELLAN, A., MOUNEYRAC, C., DUARTE, A., ROCHA-SANTOS, T. Plastic additives and microplastics as emerging contaminants: Mechanisms and analytical assessment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 158, n. 2023, p. 1-9, jan 2023.

PLASTICS EUROPE. **Plastics - the Facts 2022**: An analysis of European plastics production, demand, conversion and end-of-life management. Disponível em: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>. Acesso em: 01 dez. 2023.

PLASTICS EUROPE. **Plastics - the Fast Facts 2023**. Disponível em: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>. Acesso em: 01 dez. 2023.

PRATA, J.C., DA COSTA, J.P., LOPES, I., DUARTE, A.C., ROCHA-SANTOS, T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. **Science of The Total Environment**, v. 702, n. 1, p. 1-9, fev 2020.

PRATA, J.C., DIAS-PEREIRA, P. Microplastics in Terrestrial Domestic Animals and Human Health: Implications for Food Security and Food Safety and Their Role as Sentinels. **Animals**, v. 13, n. 4, p. 1-12, fev 2023.

PRATA, J.C., REIS, V., DA COSTA, J.P., MOUNERYAC, C., DUARTE, A.C., ROCHA-SANTOS, T. Contamination issues as a challenge in quality control and quality assurance in microplastics analytics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, n. 2021, p. 1-8, fev 2021.

PRIMPKE, S., WIRTH, M., LORENZ, C., GERDTS, G. Reference database design for the automated analysis of microplastic samples based on Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 2018, p.

5131–5141, jul 2018.

QIAO, R., DENG, Y., ZHANG, S., WOLOSKER, M. B., ZHU, Q., REN, H., ZHANG, Y. Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. **Chemosphere**, v. 236, n. 2019, p. 1-1, dez 2019.

RADLMAIER, V., HECKEL C., WINNACKER, M., ERBER, A., KOERBER, H. Effects of thermal cycling on polyamides during processing. **Thermochimica Acta**, v. 648, p. 44-51, fev 2017.

RAGUSA, A., NOTARSTEFANO, V., SVELATO, A., BELLONI, A., GIOACCHINI, G., BLONDEEL, C., ZUCHELLI, E., DE LUCA, C., D'AVINO, S., GULOTTA, A., CARNEVALI, O., GIORGINI, E. Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. **Polymers**, v.14, n.13, p.1-14, jun 2022.

RAHMAN, A., SARKAR, A., YADAV, O.P., ACHARI, G., SLOBODNIK, J. Potential human health risks due to environmental exposure to nano- and microplastics and knowledge gaps: A scoping review. **Science of The Total Environment**, v. 757, n. 2021, p. 1-13, fev 2021.

RAMASAMY, E.V., HARIT, A.K. **Microplastics in Human Consumption**. 1st edition. Boca Raton: CRC Press, 2023.

RAMSPERGER, A.F.R.M., NARAYANA, V.K.B., GROSS, W., MOHANRAJ, J., THELAKKAT, M., GREINER, A., SCHMALZ, H., KRESS, H., LAFORSCH, C. Environmental exposure enhances the internalization of microplastic particles into cells. *Science Advances*, v. 6, n. 50, 2020.

REED, S.J.B. *Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology*. 2nd edition. Cambridge University Press, 1993.

RINCON-RUBIO, L.M., FAYOLLE, B., AUDOUIN, L., VERDU, J. A general solution of the closed-loop kinetic scheme for the thermal oxidation of polypropylene. **Polymer Degradation and Stability**, 74, 177–188, 2001.

ROMANELLO, M., DI NAPOLI, C., DRUMMOND, P., GREEN, C., KENNARD, H., LAMPARD, P. The 2022 report of the Lancet Countdown on health and climate change: health at the mercy of fossil fuels. **The Lancet Countdown**, v. 400, n. 10363, p. 1619-1654, nov 2022.

ROOT, S.E., SAVAGATRUP, S., PRINTZ, A.D., RODRIQUEZ, D., LIPOMI, D.J. Mechanical properties of organic semiconductors for stretchable, highly flexible, and mechanically robust electronics. **Chemical Review**, v. 117, n. 9, p. 6467–6499, mar 2017.

ROUILLON, C., BUSSIERE, P.O., DESNOUX, E., COLLIN, S., VIAL, C., THERIAS, S., GARDETTE, J.L. Is carbonyl index a quantitative probe to monitor polypropylene photodegradation? **Polymer Degradation and Stability**, v. 128, p. 200–208, 2016.

RUBIO-ARMENDÁRIZ, C., ALEJANDRO-VEGA, S., PAZ-MONTELONGO, S., GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A.J., CARRASCOSA-IRUZUBIETA, C.J., HARDISSON-DE LA TORRE, A. Microplastics as Emerging Food Contaminants: A Challenge for Food Safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.19, n. 1174. p. 1-14, jan 2022.

SADEGHI, A., FAROKHI, F., SHALIZAR-JALALI, A., NAJAFI, G. Protective effect of vitamin E on sperm quality and in vitro fertilizing potential and testosterone concentration in polyvinyl chloride treated male rats. **Veterinary Research Forum**, v. 11, n. 3, p. 257–263, 2020.

SANTOS, T., TAMANAGA, B., ATHIÊ, A.A.R., MIYAMARU, E.S. Influência da granulometria do resíduo de embalagens Longa Vida na preparação de placas Drywall InterfacEHS. **Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 12, n. 1, p. 40-55, jun 2017.

SAVINO, I., CAMPANALE, C., TROTTI, P., MASSARELLI, C., CORRIERO, G., URICCHIO, V.F. Effects and Impacts of Different Oxidative Digestion Treatments on Virgin and Aged Microplastic Particles. **Polymers**, v. 14, n. 10, p.1-21, mai 2022.

SCARASCIA-MUGNOZZA, G., SICA, C., RUSSO, G. Plastic materials in European agriculture: actual use and perspectives. **Journal of Agricultural Engineering**, v.3, p.15-28, dez 2011.

SCHELL, T., RICO, A., CHERTA, L., NOZAL, L., DAFOUZ, R., GIACCHINI, R., VIGHI, M. Influence of microplastics on the bioconcentration of organic contaminants in fish: Is the “Trojan horse” effect a matter of concern? **Environmental Pollution**, v. 306, ago 2022.

SCHERINGER, M. Long-range transport of organic chemicals in the environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 677-90, 2009.

SCHOLZ-AHRENS, K.E., AHRENS, F., BARTH, C.A. Nutritional and health attributes of milk and milk imitations. **European Journal of Nutrition**, v. 59, p. 19-34, 2020.

SCHWABL, P., KOPPEL, S., KONIGSHOFER, P., BUCSICS, T., TRAUNER, M., REIBERGER, T., LIEBMANN, B. Detection of Various Microplastics in Human Stool. **Annals of Internal Medicine**, v. 171, n. 7, p. 453-458, 2019.

SHRUTI, V.C., PÉREZ-GUEVARA, F., ELIZALDE-MARTINEZ, I., KUTRALAM-MUNIASAMY, G. First study of its kind on the microplastic contamination of soft drinks, cold tea and energy drinks - Future research and environmental considerations. **Science of The Total Environment**, v. 726, jul 2020.

SILVA-CAVALCANTI, J.S., SILVA, J.D.B., FRANÇA, E.J., ARAÚJO, M.C.B., GUSMÃO, F. Microplastics ingestion by a common tropical freshwater fishing resource. **Environmental Pollution**, v. 221, n. 2017, p. 218-226, fev 2017.

SINGH, S., LI, S.S.L. Epigenetic Effects of Environmental Chemicals Bisphenol A and Phthalate. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, n. 8, p. 10143-10153, ago 2012.

SOLOMANDO, A., CAPÓ, X., ALOMAR, C., ÁLVAREZ, E., COMPA, M., VALENCIA, J.M., PINYA, S., DEUDERO, S., SUREDA, A. Long-term exposure to microplastics induces oxidative stress and a pro-inflammatory response in the gut of *Sparus aurata* Linnaeus, 1758. **Environmental Pollution**, v. 266, nov 2020.

SONG, Y.K., HONG, S.H., JANG, M., HAN, G.M., RANI, M., LEE, J., SHIM, W.J. A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. **Marine Pollution Bulletin**, v. 93, n.1-2, p. 202-209, abr 2015.

STEER, M., GEYER, R. Plastics and Microplastics: Impacts in the Marine Environment. In: BIANCHI, M.S.; CIMADEVILA, M.; TRETTNAK, W. **Mare Plasticum: The Plastic Sea**. 1st edition. Berlin: Springer, 2020. p. 49–72.

STOCK, F., KOCHLEUS, C., BÄNSCH-BALTRUSCHAT, B., BRENNHOLT, N., REIFFERSCHIED, G. Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment—A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 84–92, 2019.

SUN, H., CHEN, N., YANG, X., XIA, Y., WU, D. Effects induced by polyethylene microplastics oral exposure on colon mucin release, inflammation, gut microflora composition and metabolism in mice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 220, n. 1, p. 1-9, set 2021.

SYBERG, K., KHAN, F.R., SELCK, H., PALMQVIST, A., BANTA, G.T, DALEY, J., SANO, L., DUHAIME, M.B. Microplastics: addressing ecological risk through lessons learned. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 5, p.945-953, fev 2015.

TETRAPAK. **Processos de filtração**. Disponível em: [www.tetrapak.com/pt-br/solutions/integrated-solutions-equipment/processing-equipment/membrane-filtration/filtration-processes#:~:text=%E2%80%8B%E2%80%8B%E2%80%8B%E2%80%8B%E2%80%8B,e%20osmose%20reversa%20\(OR\)](http://www.tetrapak.com/pt-br/solutions/integrated-solutions-equipment/processing-equipment/membrane-filtration/filtration-processes#:~:text=%E2%80%8B%E2%80%8B%E2%80%8B%E2%80%8B%E2%80%8B,e%20osmose%20reversa%20(OR)). Acesso em: 15 fev. 2024.

THOMPSON, R. C. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? **Science**, v. 304, n. 5672, p. 838–838, mai 2004.

THUSHARI, G.G.N., SENEVIRATHNA, J.D.M. Plastic pollution in the marine environment. **Heliyon**, v. 6, n. 2020, p. 1-16, ago 2020.

TIRKEY, A., SHEO, L., UPADHYAY, B. Microplastics: An overview on separation, identification and characterization of microplastics. **Marine Pollution Bulletin**, v. 170, p. 1-12, mar 2021.

TOKIWA, Y., CALABIA, B., P., UGWU, C.U., AIBA, S. Biodegradability of Plastics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 9, p. 3722-3742, 2009.

VAN DER VEEN, I., VAN MOURIK, L.M., VAN VELZEN, M.J.M, GROENEWOUD, Q.R., LESLIE, H.A. Plastic Particles in Livestock Feed, Milk, Meat and Blood - A Pilot Study. **Plastic Soup Foundation**. Amsterdam, 2022.

VASCONCELLOS, M.A.Z., & HINRICHS, R. Microanálise em baixo vácuo por dispersão em energia de raios X característicos. *In*: VASCONCELLOS, M.A.Z., & HINRICHS, R. **Técnicas instrumentais não destrutivas aplicadas a gemas do Rio Grande do Sul**. 1ª edição. Porto Alegre: IGeo/UFRGS, 2014. p. 107-131.

VENDEL, A. L., BESSA, F., ALVES, V. E. N., AMORIM, A. L. A., PATRICIO, J., & PALMA, A. R. T. Widespread microplastic ingestion by fish assemblages in tropical estuaries subjected to anthropogenic pressures. **Marine Pollution Bulletin**, v. 117, n.1–2, p. 448–455, 2017.

WALKER S., ROTHMAN R. Life cycle assessment of bio-based and fossil-based plastic: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 261, p. 1-15, jul 2020.

WANG, F., WANG, B., DUAN, L., ZHANG, Y., ZHOU, Y., SUI, Q., XU, D., QU, H., YU, G. Occurrence and distribution of microplastics in domestic, industrial, agricultural and aquacultural wastewater sources: A case study in Changzhou, China. **Water Research**, v.182, n.115956, p.1-10, set 2020.

WILCOX, C., VAN SEBILLE, E., HARDESTY, B.D. Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. **Environmental Sciences**, v. 112, n. 38, p. 11899-11904, ago 2015.

WILLERS, C.D., FERRAZ, S.P., CARVALHO, L.S., RODRIGUES, L.B. Determination of indirect water consumption and suggestions for cleaner production initiatives for the milk-producing sector in a Brazilian middle-sized dairy farming. **Journal of Cleaner Production**, v. 72, p. 146–152, 2014.

XU, H., HOET, P.H.M., NEMERY, B. *In vitro* toxicity assessment of polyvinyl chloride particles and comparison of six cellular systems. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 65, n. 16, p. 1141–1159, 2002.

YANG, D., SHI, H., LI, L., LI, J., JABEEN, K., KOLANDHASAMY, P. Microplastic Pollution in Table Salts from China. **Environmental Science and Technology**, v. 49,

n. 22, p.13083-13736, nov 2015.

YANG, Y., XIE, E., DU, Z., PENG, Z., HAN, Z., LI, L., ZHAO, R., QIN, Y., XUE, M., LI, F., HUA, K., YANG, X. Detection of Various Microplastics in Patients Undergoing Cardiac Surgery. **Environmental Science & Technology**, v. 57, n. 30, p. 10911-10918, jul 2023.

YOUNG, H.S., MCCAULEY, D.J., GALETTI, M., DIRZO, R. Patterns, causes, and consequences of anthropocene defaunation. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic**, v. 47, p. 333–358, 2016.

YOZUKMAZ, A. Detection and public health risk assessment of microplastics in disposable (PET) bottled water produced and sold locally in the Aegean Region. **Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 39, n. 4, p. 275-283, 2022.

ZETTLER, E.R., MINCER, T.J., AMARAL-ZETTLER, L.A. Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. **Environmental Science and Technology**, 47, 7137–7146, 2013.

ZHANG, J., WANG, L., TRASANE, L., KANNAN, K. Occurrence of Polyethylene Terephthalate and Polycarbonate Microplastics in Infant and Adult Feces. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 8, n. 11, p. 989-994, 2021.

ZHANG, Q., LIU, L., JIANG, Y., ZHANG, Y., FAN, Y., RAO, W., QIAN, X. Microplastics in infant milk powder. **Environmental Pollution**, v. 323, n. 2023, p 1-8, abr 2023.

ZHENG, H., WANG, J., WEI, X., CHANG, L., LIU, S. Proinflammatory properties and lipid disturbance of polystyrene microplastics in the livers of mice with acute colitis. **Science of The Total Environment**, v. 750, n. 2021, p.1-10, jan 2021.

ZHENG, J., SUH, S. Strategies to reduce the global carbon footprint of plastics. **Nature Climate Change**, v. 9, p. 374–378, abr 2019.

ZHU, F., ZHU, C., WANG, C., GU, C. Occurrence and Ecological Impacts of Microplastics in Soil Systems: A Review. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.102, p.741–749, mai 2019.

ZHU, L., ZHU, J., ZUO, R., XU, Q., QUIAN, Y. Identification of microplastics in human

placenta using laser direct infrared spectroscopy. **Science of The Total Environment**, v. 856, jan 2023.

#### **4 HIPÓTESE**

O leite fluído comercializado para consumo humano está contaminado por microplásticos, tanto aqueles processados pela tecnologia de ultra alta temperatura, como os pasteurizados, podendo haver distinção na concentração de partículas e/ou nas suas características (cor, formato e tamanho), conforme a concentração de gordura do produto.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença e a caracterização de microplásticos em leite fluído pasteurizado e UHT nas diferentes apresentações desses produtos, conforme a concentração de gordura que apresentam (leite integral, semidesnatado e desnatado).

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as marcas de leite fluído pasteurizado e UHT mais frequentemente comercializadas nas principais redes de supermercados da cidade de realização do estudo. As amostras selecionadas contemplarão aquelas acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade (PEBD), em garrafas de polietileno tereftalato (PET) e em embalagens cartonadas de múltiplas camadas;
- Proceder às técnicas de controle de qualidade, de modo a evitar a contaminação cruzada, assegurando registrar a contaminação das amostras de maneira fidedigna;
- Submeter as amostras de leite à técnica de digestão oxidativa com peróxido de hidrogênio a 30%;
- Filtrar as amostras digeridas em sistema de filtração a vácuo, seguindo as recomendações de controle de qualidade, com o uso de controle negativo;
- Analisar os filtros resultantes por microscopia óptica e registrar as partículas de microplásticos presentes, na intenção de caracterizá-las conforme o formato e cor;
- Estabelecer o tamanho de cada partícula fluorescente de microplástico visualizada, e posteriormente o tamanho médio destas;
- Identificar a composição polimérica das partículas detectadas por espectroscopia Raman;
- Realizar registros de imagens de algumas das partículas por ventura encontradas utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura.
- Discutir quais os possíveis pontos de incorporação de microplásticos na cadeia produtiva do leite.

## 6 ARTIGO

### **Detecção de microplásticos em leite pasteurizado e UHT: microscopia óptica, microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica e espectroscopia Raman**

Samanta Stinghen de Abreu<sup>1\*</sup>, Stael Málaga Carrilho<sup>1</sup>, Natalia Gonzaga<sup>1\*</sup>, Ronaldo Tamanini<sup>1</sup>, Alexandre Urbano<sup>2</sup>, Henrique de Santana<sup>3</sup>, Walter Ruggeri Waldman<sup>4</sup>, and Vanerli Beloti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal - LIPOA, Universidade Estadual de Londrina, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Física, Laboratório de Filmes Finos e Materiais - FILMAT, Universidade Estadual de Londrina, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Química, Laboratório de Espectroscopia - ESPEC, Universidade Estadual de Londrina, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Física, Química e Matemática, Universidade Federal de São Carlos, Brasil

Título curto: **Microplásticos em leite fluido**

\*Correspondente: Samanta Stinghen de Abreu

Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal

Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid, PR-445

CEP 86057-970

Londrina - PR, Brazil

telefone +55(41) 99794-2468

*E-mail: samanta.stinghen@uel.br*

## Resumo

Os MPs são partículas poliméricas sintéticas de variadas composições, assim definidas quando apresentam tamanho  $<5 \mu\text{m}$ . Esses contaminantes podem ser encontrados em diversos compartimentos ambientais, inclusive em alimentos. Um dos maiores interesses no monitoramento dos alimentos quanto à presença de MPs é devido aos potenciais riscos à saúde reportados em estudos com animais, apontando a possibilidade de efeitos semelhantes ocorrerem em seres humanos, já que a rota de entrada mais comum dessas partículas é via ingestão. O leite é um dos principais componentes da dieta de grande parte da população, abrangendo indivíduos de todas as faixas etárias, e já foi investigado previamente em outros países quanto à contaminação por MPs. Não foram encontrados relatos sobre resíduos de MPs em leite no Brasil, estimulando o desenvolvimento desse estudo, utilizando técnicas microscópicas acessíveis e preliminares de identificação de MPs no leite no país. Esse é o primeiro relato do uso do corante Vermelho do Nilo para identificação de MPs no leite, uma abordagem acessível e que reduz a subjetividade da observação microscópica de partículas suspeitas. A técnica executada envolveu a digestão oxidativa das amostras de leite UHT e pasteurizado (leite fresco) com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30%, seguida por filtração em membranas com porosidade de  $11 \mu\text{m}$  e análises microscópicas. Foram estudadas 44 amostras de leite fluido, sendo consideradas nove marcas de leite UHT e três marcas de leite pasteurizado (também denominado leite fresco), com diferentes teores de gordura. Na microscopia de fluorescência com o corante Vermelho do Nilo, 21 amostras apresentaram potenciais MPs, com uma carga média de  $3,24 \text{ partículas L}^{-1}$ , predominantemente fragmentos translúcidos com tamanho médio de  $150 \mu\text{m}$ . Na análise espectroscópica Raman, apenas três amostras apresentaram MPs, caracterizados como poliamida em carga média de  $2 \text{ MPs L}^{-1}$ . O tamanho médio desses contaminantes foi de  $200 \mu\text{m}$ . Outras sete amostras de três marcas distintas foram consideradas potencialmente contaminadas, mas a análise do espectro não foi conclusiva. Considerando-as MPs, a carga média observada se elevaria a  $2,6 \text{ MPs L}^{-1}$ , provenientes majoritariamente das amostras do tipo UHT integral, havendo apenas uma marca de leite UHT desnatado e uma do tipo pasteurizado semidesnatado. Para visualização detalhada da superfície de algumas partículas, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, para a observação do desgaste e das características de partículas suspeitas, que se mostraram ásperas e com bordas desgastadas, em sua maioria. Pode-se concluir que os MPs estão presentes no leite de consumo, mas em quantidade pequena e inferior a encontrada em estudos com outras bebidas. Embora a microscopia de fluorescência com o corante Vermelho do Nilo seja simples e auxilie na semiquantificação de MPs, as amostras a ela submetidas tornam-se inutilizáveis para análise de espectroscopia Raman, impossibilitando a confirmação. Nenhuma das técnicas utilizadas se mostrou capaz de demonstrar a quantidade exata de MPs presentes no leite, estando sujeitas a falso negativos e/ou positivos. Assim, são requeridos outros estudos que tragam metodologias mais precisas, ampliem a amostragem e tragam informações sobre pontos de incorporação dos contaminantes neste alimento.

**Palavras-chave:** leite, microplásticos, microscopia, Vermelho do Nilo, Raman

## **Introdução**

Popularizados a partir de meados da década de 1950 devido ao baixo custo, versatilidade e durabilidade, os plásticos fazem parte de diversas atividades humanas, incluindo a medicina, a construção civil, a indústria automobilística e a indústria de alimentos (Geyer, R., 2020; Geyer et al., 2017). A presença deste tipo de material no cotidiano é praticamente inevitável, e a atual produção mundial ultrapassa 400 milhões de toneladas anualmente (Plastics Europe, 2023). A combinação entre o uso momentâneo com descarte excessivo destes produtos, associada à lenta degradação e falhas na gestão de resíduos urbanos, culmina no acúmulo de plásticos e a geração de microplásticos (MPs), que viajam pelo ar, solo e água e são considerados onipresentes (Jambeck et al., 2015; Napper e Thompson, 2016). Os MPs são partículas poliméricas sintéticas de tamanho  $< 5$  mm (Arthur et al., 2009), já detectadas em uma série de alimentos, como peixes (Silva-Cavalcanti et al., 2017), mel, cerveja, leite e refrigerantes (Diaz-Basantes et al., 2020), e amostras biológicas humanas, como fezes (Schwabl et al., 2019), tecido cardíaco (Yang et al., 2023) e placenta (Ragusa et al., 2021), comprovando a incorporação de tais partículas principalmente via ingestão, mas também pela inalação e contato dérmico.

O real impacto à saúde humana provocado pelos MPs ainda é uma incógnita a ser debatida no campo da ciência, contudo, autores levantam hipóteses sobre as principais decorrências da sua ingestão, baseados em dados divulgados em estudos com animais. Conforme levantado, os MPs incorporados ao organismo humano teriam o potencial de causar estresse oxidativo aos tecidos e células, inflamação, translocação entre órgãos e possibilidade de carcinogênese, especialmente quando se trata de partículas inferiores a  $10 \mu\text{m}$  (Prata et al., 2020). A toxicidade dessas partículas depende de uma série de fatores, como sua composição polimérica, a presença de aditivos e/ou poluentes e as interações químicas ocorridas entre estes elementos (Atugoda et al., 2021). Além disso, sabe-se que o formato das partículas também contribui na intensidade dos danos gerados: as fibras tendem a apresentar maior grau de acumulação nos órgãos, e conseqüentemente maior intensidade de danos gerados (Qiao et al., 2019). Por essas razões, faz-se necessária a busca por informações dos níveis de contaminação e caracterização de MPs nas mais diversas matrizes, junto ao debate das possíveis origens destes contaminantes e soluções para evitar sua dispersão.

Poucas informações sobre a presença de MPs no leite foram divulgadas até o momento, e nenhum estudo havia sido conduzido antes no Brasil. O leite é um dos principais componentes da dieta da população em diferentes faixas etárias, e o Brasil está entre os maiores produtores mundiais deste alimento (Basaran et al., 2023; Scholz-Ahrens et al.,

2020). Vista a importância e a necessidade em monitorar esse alimento, o presente estudo tem o objetivo de, com técnicas microscópicas, verificar a presença e caracterizar MPs no leite de consumo, quanto a cor, formato e tamanho das partículas.

## **Material & Métodos**

### *Controle de qualidade aplicado ao processamento das amostras*

Para assegurar a qualidade da leitura dos resultados, a técnica foi totalmente fundamentada nos cuidados recomendados para análises de detecção de MPs. Foram adotadas ações como: uso de jaleco de algodão; uso exclusivo de materiais de vidro ou metal; lavagem e remoção de matéria orgânica dos utensílios com HNO<sub>3</sub> 5% durante 12 horas, seguido por séries de enxágues com água destilada e água miliQ filtrada; pré-filtração de todas as soluções utilizadas no estudo (água miliQ, álcool 70% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%); cobertura de todos os utensílios com papel alumínio sempre que possível; utilização de cabine de fluxo laminar para manipulação das amostras; uso de controles negativos e de filtros expostos ao ambiente para a garantia da leitura fidedigna das amostras e lavagem e novo tratamento com HNO<sub>3</sub> dos utensílios utilizados antes de iniciar a próxima análise (Prata et al., 2021).

Adicionalmente, as portas e janelas da sala de análise foram mantidas fechadas, permitiu-se baixo fluxo de pessoas circulando pela área e as mãos do manipulador das amostras eram lavadas cuidadosamente em água corrente, seguida de lavagem com água miliQ e álcool 70%, ambos previamente filtrados, antes de cada análise. As unhas foram mantidas curtas e sem aplicação de esmalte ao longo de todo o estudo, para evitar contaminações externas. As soluções utilizadas na técnica foram filtradas em membranas de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm (GVS Life Sciences, Bologna). Filtros destinados à garantia de qualidade foram utilizados no decorrer das análises, sendo estes denominados como: filtros de controle de qualidade (expostos no interior da cabine de fluxo laminar, um ao fundo e outro próximo à área externa na janela de proteção, próximo à região de manipulação das amostras), filtros de controle negativo (destinados à filtração da mistura das mesmas soluções utilizadas na digestão do leite, ou seja, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% e água miliQ) e filtros brancos (retirados diretamente da embalagem para análise da carga de contaminação de origem).

Os filtros de controle de qualidade foram mantidos abertos dentro da cabine de fluxo laminar durante todas as etapas de manipulação da análise, tanto no dia da diluição das amostras com peróxido de hidrogênio quanto no dia da filtração. As placas eram abertas apenas após a higienização completa da cabine e das mãos, e com o equipamento já ligado, garantindo que as amostras estivessem preparadas para manipulação. Na fase de diluição, realizada no primeiro dia, os filtros de controle ficaram expostos por aproximadamente 8 minutos por

amostra. Após as 72 horas de digestão, durante a etapa de filtração, o tempo médio de exposição dos filtros aumentou para cerca de 16 minutos por amostra filtrada. Assim, ao longo de todo o processo, o tempo total de exposição dos filtros foi, em média, de 24 minutos por amostra.

#### *Seleção das amostras*

No intuito de selecionar o universo amostral, procedeu-se à consulta das principais redes de supermercados da cidade de Londrina, no Estado do Paraná, Brasil, com o propósito de identificar as marcas mais frequentes e conhecidas de leite pasteurizado, em alguns países denominado leite fresco, e de leite processado em ultra alta temperatura (UHT). Dessa forma, compilou-se um elenco de onze marcas, disponíveis nas versões integral e desnatada, ou integral e semidesnatada. Dentre as marcas selecionadas, oito eram exclusivamente do tipo UHT e duas exclusivamente do tipo pasteurizado, havendo uma marca com ambas as variedades. Considerando que a técnica de isolamento de MPs foi realizada em duplicatas, 44 unidades de leite foram avaliadas no estudo. Cumpre ressaltar que cada replicata foi devidamente identificada, sendo designada em sistema alfanumérico.

#### *Tratamento de digestão do leite e filtração*

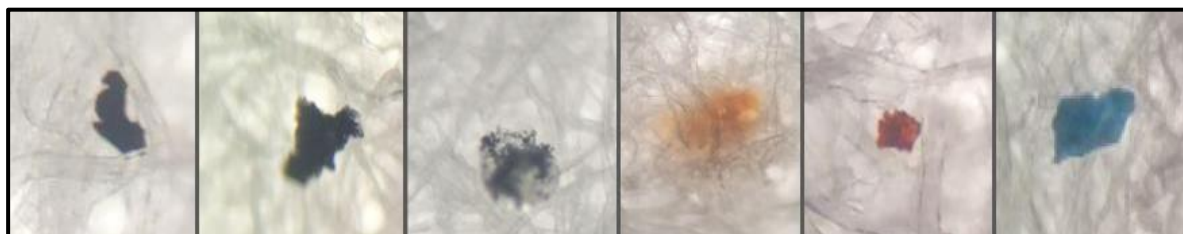
Todas as amostras do estudo foram submetidas a uma digestão oxidativa com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 30% durante 72 horas, seguindo os procedimentos de Diaz-Basantes et al. (2020), com adaptações conforme a concentração de gordura presente no leite. A proporção de  $H_2O_2$  foi definida como 0,4, e o volume do reagente foi ajustado de acordo com a quantidade de gordura, como descrito em detalhe no Documento Suplementar. O método foi previamente validado por comparação com outras abordagens, como aquecimento da amostra, uso de pepsina para digestão enzimática e aplicação de tensoativo polissorbatato. A digestão oxidativa foi considerada a técnica mais eficiente em termos de custo-benefício, sendo mais rápida e prática para aplicação até a etapa de filtração no contexto deste estudo. Em seguida, isolou-se as partículas em filtros de celulose (Whatman grade 1, 47 mm de diâmetro, porosidade de 11  $\mu m$ ) acoplados no frasco de Buchner, conectado à bomba de vácuo (aproximadamente 0,5 bar). Após o conteúdo da amostra ser vertido, foi realizado enxágue com 300 mL de água miliQ filtrada no balão volumétrico, para assegurar que as partículas presentes nas amostras não permaneceriam aderidas à vidraria. A água de enxágue foi filtrada no mesmo filtro da amostra. Por fim, os filtros foram acondicionados em placas de Petri de vidro posteriormente envolvidas com papel alumínio e armazenadas em temperatura ambiente até o momento da identificação das partículas.

#### *Visualização de partículas em microscópio óptico*

Na primeira fase de identificação, as partículas detectadas nos filtros resultantes do processo de isolamento por filtração foram minuciosamente examinadas, seguindo o protocolo de leitura indicado no guia desenvolvido pela Marine & Environmental Research Institute (MERI). Esta avaliação abrangeu todos os filtros obtidos, incluindo os dois ou mais filtros derivados de cada amostra, os filtros do controle negativo e aqueles que foram expostos na cabine de fluxo laminar para controle de qualidade do ambiente onde a filtração foi realizada. Para essa avaliação, utilizou-se um microscópio Nikon Epson, configurado com uma objetiva de aumento 10x para capturas das imagens por uma câmera convencional de smartphone. Nessa etapa, foram examinados os formatos, cores e a quantidade de partículas visíveis presentes nos filtros, excluindo-se da contagem aquelas que seguiam padrões semelhantes às encontradas em filtros de controle de qualidade.

Previamente à observação e contagem das partículas nos filtros das amostras de leite, os filtros destinados à garantia de qualidade (filtros de controle de qualidade, de controle negativo e brancos) foram checados detalhadamente. As partículas presentes em tais filtros foram quantificadas a fim de se obter informação quanto ao nível de contaminação da técnica, e foram registradas para comparações futuras com os filtros das amostras e desconsiderações de partículas que seguissem padrões semelhantes de cor e formato (Figura 1). Esses procedimentos visam evitar a superestimação da quantificação de MPs nas amostras estudadas.

**Figura 1** - Padrões de partículas observadas em filtros de controle de qualidade, controle negativo e branco (filtros retirados diretamente das embalagens). Partículas semelhantes a essas, quando presentes em filtros de amostras de leite, foram desconsideradas nas quantificações e caracterizações.



Fonte: os autores (2023)

#### *Visualização de partículas em microscópio de fluorescência*

Para uma análise mais direcionada aos MPs, os filtros das amostras foram lidos em microscopia de fluorescência após aplicação do corante Vermelho do Nilo diluído em metanol na concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Inlab, Brasil), seguindo um protocolo prévio de

remoção de matéria-orgânica (Erni-Cassola et al., 2017). O registro das imagens das partículas fluorescentes e seus tamanhos foram realizados no programa Axio Vision (Release 4.7). A visualização das partículas foi realizada em microscópio de fluorescência (Zeiss, Alemanha), comprimento de onda 475-625 nm, em objetiva 10X para a captura das imagens, realizada pela câmera integrada (AxioCam MRc5).

#### *Identificação polimérica por espectroscopia Raman*

A composição polimérica das partículas isoladas foi determinada por um equipamento espectroscópio Raman, acoplado a um microscópio confocal ajustado em magnificação 50x (WITec Alpha300 M+). A fonte de excitação aplicada às partículas é composta por raio laser em comprimento de onda de 532 nm, e a faixa de espectro utilizada centrou-se no intervalo de 500 a 2.000  $\text{cm}^{-1}$ . A intensidade do laser foi ajustada dependendo das características da partícula, a fim de ajustar os espectros sem danificá-las. Para reduzir ruídos e melhorar a qualidade dos espectros obtidos, a correção polinomial da linha de base foi aplicada (software Origin Pro 2024, OriginLab Corporation). A interpretação dos espectros gerados foi feita pelos padrões de bandas associados a certos grupos químicos funcionais, além da consulta à base de dados pública (PublicSpectra) e aos espectros relatados na literatura. Foram registradas também imagens das partículas analisadas nessa etapa, com posterior dimensionamento dos microplásticos por meio do programa *ImageJ*.

#### *Geração de imagens de partículas isoladas em microscópio eletrônico de varredura*

Após a visualização em microscopia óptica e a geração de espectros no microscópio Raman previamente calibrado, selecionou-se três partículas para a análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), com a finalidade de observar as características de superfície, a integridade e a estrutura física em maiores detalhes inacessíveis por microscopia óptica. As partículas foram fixadas em *stubs* com fita de carbono dupla-face para a realização do banho de ouro previamente. As imagens foram geradas individualmente com tensão de aceleração de 25 kV no modo de elétron secundário. O microscópio utilizado (FEI - Quantum 200, Oregon, EEUU) foi ajustado em diferentes magnificações, que variaram entre 200 a 10.000X para a obtenção das imagens com o máximo detalhamento da superfície possível. Os ajustes de magnificação foram realizados dessa forma devido aos diferentes tamanhos e formatos das partículas.

### **Resultados e Discussão**

Quanto à etapa de garantia de qualidade do ambiente de trabalho, partículas pretas foram as mais frequentemente observadas nos filtros mantidos na cabine de fluxo laminar no decorrer das análises, além de serem observadas também pequenas manchas marrons, partículas

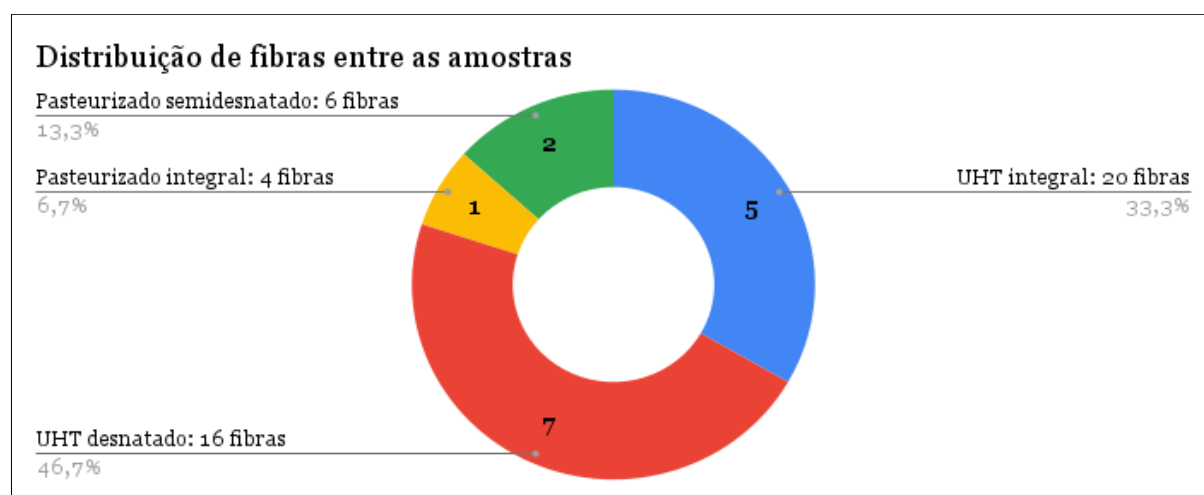
vermelhas e azuis. Dentre os filtros de controle de qualidade mantidos próximos à janela de proteção do fluxo laminar, foi registrada a média de 1,21 partículas/filtro, com desvio padrão de 1,11; enquanto os filtros mantidos no fundo da cabine (próximo da área de manipulação) apresentaram contaminação com média de 0,75 partículas/filtro, com desvio padrão de 1,21. O número total destes filtros foi de 28, tanto para os que ficaram próximos à janela de proteção, quanto aqueles que ficaram no fundo da cabine. A maioria destas partículas eram desfeitas ao entrarem em contato com uma agulha fina, o que indica a maior possibilidade de não se tratar de plástico, e sim de matéria orgânica (Kutralam-Muniasamy et al., 2020). No entanto, os filtros brancos apresentaram partículas resistentes de coloração azul, provavelmente derivadas da tinta da embalagem. Mesmo após serem estocados em uma placa de Petri de vidro limpa dentro da cabine de fluxo laminar, alguns filtros brancos analisados durante o estudo apresentaram contaminação (em média 1,30 partículas/filtro, com desvio padrão de 0,756 em 44 observações). Prata e colaboradores (2021), indicam como uma etapa de garantia da qualidade da técnica de isolamento de MPs a limpeza prévia dos filtros. Esse procedimento não foi adotado neste estudo, no entanto, optou-se por monitorar um filtro branco – aqueles retirados diretamente da embalagem original - a cada nova análise. Os mesmos padrões de partículas contaminantes foram observados também nos filtros de controle negativo (em média 0,66 partículas/filtro, com desvio padrão de 0,474 em 44 observações), indicando que as origens da contaminação provavelmente sejam o ar circulante na cabine e os próprios filtros originais, já que padrões distintos de partículas não foram observados, corroborando para a conclusão de garantia de qualidade das soluções do laboratório.

Embora a contaminação em filtros de controle de qualidade seja comumente relatada em estudos da área (Kiruba et al., 2022; Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Shruti et al., 2022), nenhum filtro apresentou contaminação por fibras, que podem compor até 33% da poeira de ambientes interiores, conforme descrito por Dris e colaboradores (2017). Isso destaca a importância de medidas como a limpeza prévia do ambiente e da cabine de fluxo laminar, bem como o uso de jaleco de algodão e a limitação do fluxo de pessoas, para garantir a qualidade dos resultados (Prata et al., 2021).

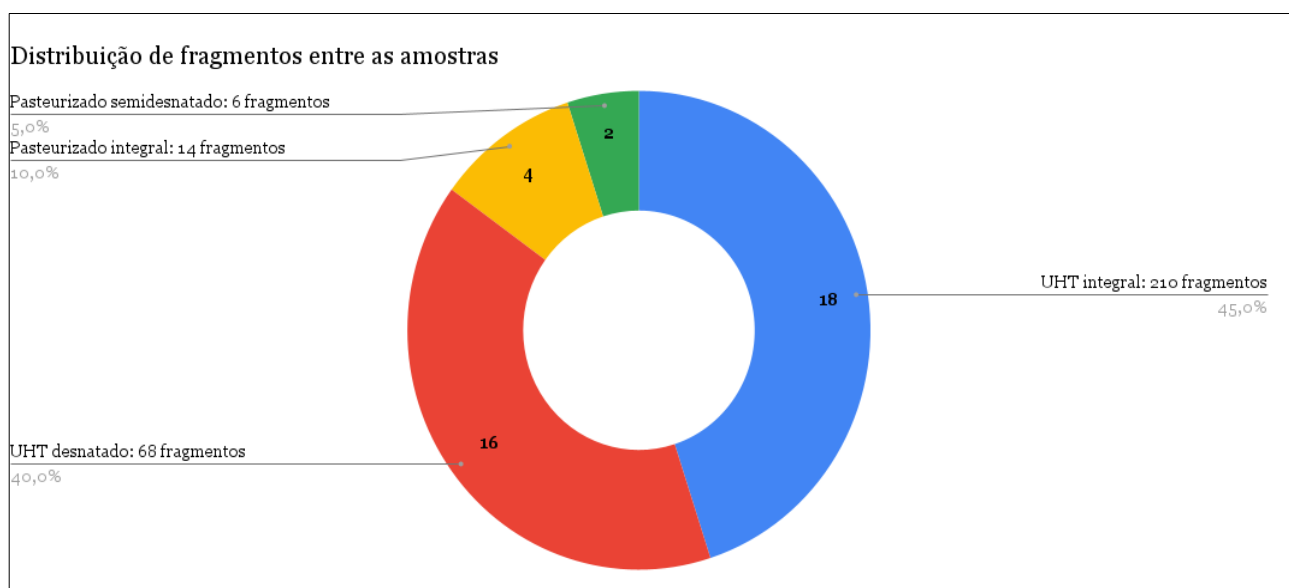
Diante o exposto, considerando os resultados obtidos na etapa de garantia da qualidade, as partículas observadas nos filtros de amostras foram caracterizadas por microscopia óptica e confirmadas por microscopia de fluorescência após aplicação do corante Vermelho do Nilo (Erni-Cassola et al., 2017), além da realização da técnica espectroscópica Raman. Foram contabilizadas 344 partículas suspeitas por microscopia óptica, detectadas em 40 das 44

amostras. Quanto ao formato, as partículas estavam distribuídas entre fibras e fragmentos, sendo detectadas 46 unidades de fibras e 298 fragmentos. A distribuição dos formatos das partículas entre as amostras está detalhada nas Figuras 2 e 3, enquanto as cores de partículas observadas no estudo estão representadas nas Figuras 4 e 5. As fibras foram observadas mais frequentemente em leite UHT desnatado (sete amostras), mas o tipo UHT integral apresentou quantidade superior desse tipo de partícula, vistas em cinco amostras. Os fragmentos foram predominantemente detectados no tipo UHT integral, com 210 partículas distribuídas em 18 amostras.

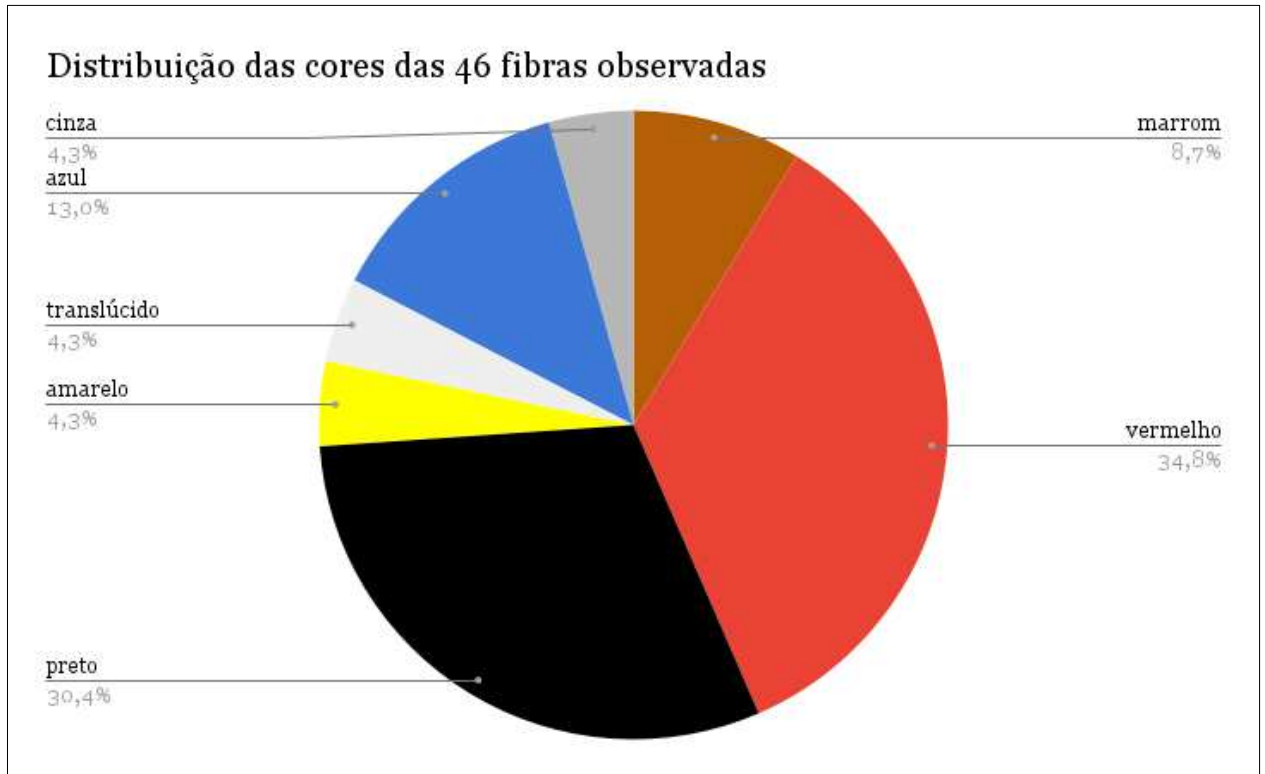
**Figura 2** – Distribuição das 46 partículas suspeitas com formato de fibras observadas por microscopia óptica nas amostras de leite analisadas, detectadas em 15 amostras distintas



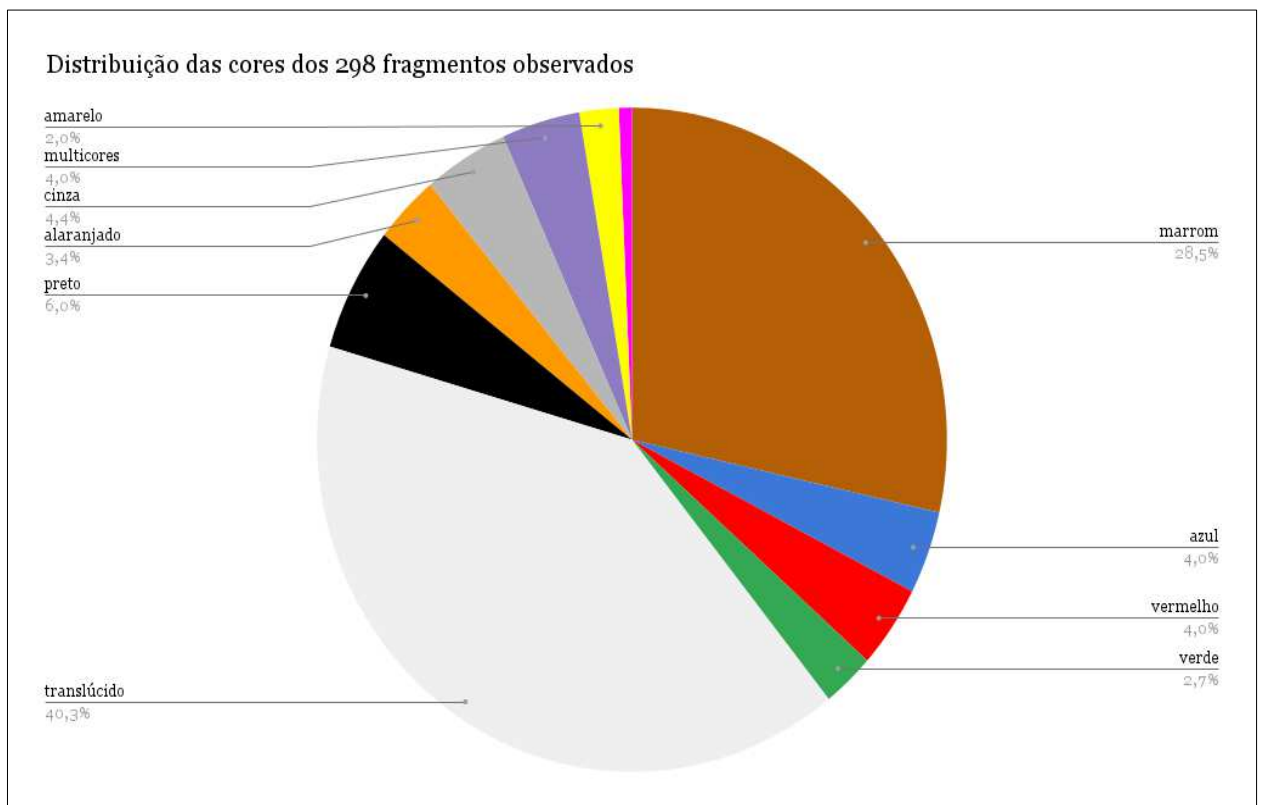
**Figura 3** – Distribuição das 298 partículas suspeitas com formato de fragmento observadas por microscopia óptica nas amostras de leite analisadas, detectadas em 40 amostras distintas



**Figura 4** – Distribuição das cores das 46 fibras observadas nas amostras de leite analisadas

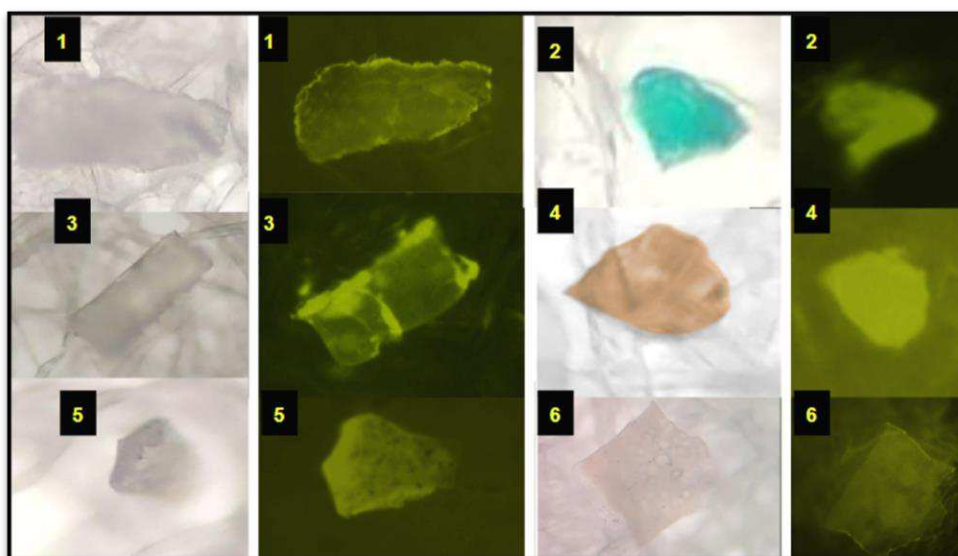


**Figura 5** – Distribuição das cores dos 298 fragmentos observadas nas amostras de leite analisadas



Um total de 68 partículas emitiram fluorescência nas condições analisadas. As 68 partículas fluorescentes são consideradas potenciais MPs (Figura 6), detectados em 47,73% do universo amostral (21/44), indicando a carga média mínima geral de 3,24 potenciais MPs L<sup>-1</sup> nas amostras analisadas. Em relação às dimensões, o tamanho médio dos potenciais MPs foi de 150 µm, variando entre 50 a 350 µm. Essa informação revela a maior probabilidade de tais partículas se tratarem de contaminantes incorporados ao leite ao longo do processamento e estocagem nas embalagens, uma vez que o tamanho médio é muito grande para terem origem diretamente do organismo dos animais, com eliminação pela glândula mamária. Estudos apontam que o tamanho médio de MPs que são capazes de transpassar as barreiras biológicas variam entre 10 a 15 µm (Alimba et al., 2021; Ragusa et al., 2022; Prata et al., 2020; Barceló et al., 2023).

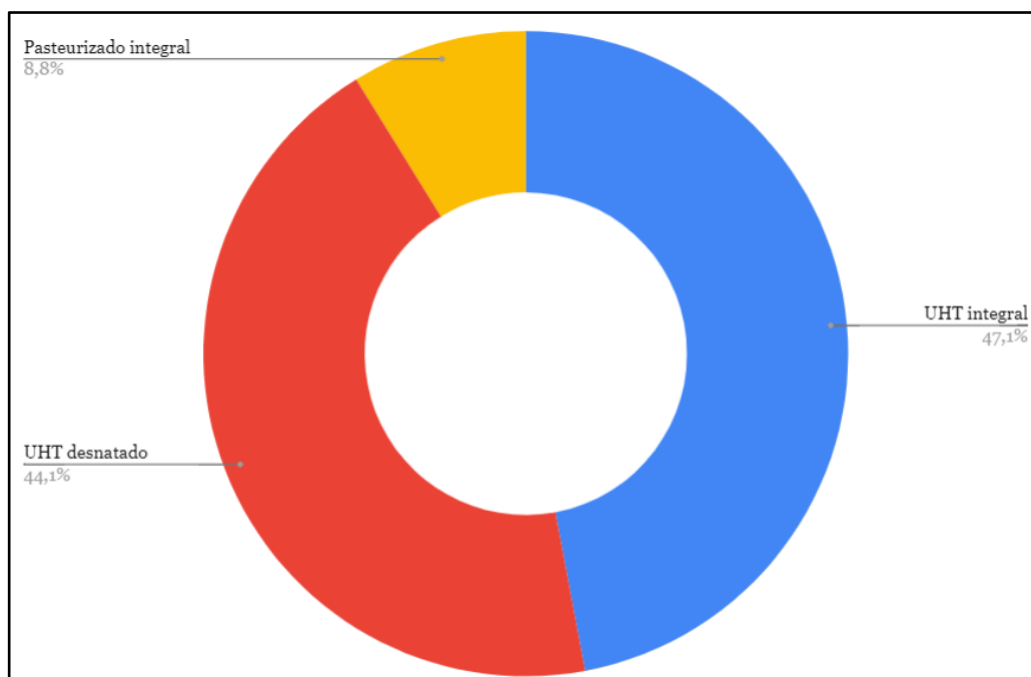
**Figura 6** – Fragmentos de potenciais MPs detectados em microscopia óptica e de fluorescência provenientes das amostras de leite analisadas no estudo



Fonte: os autores (2023)

A distribuição das partículas fluorescentes foi avaliada conforme os tipos de leite analisados no estudo (Figura 7), que variaram conforme o tipo de processamento térmico submetido (pasteurizado, também conhecido como fresco, e UHT), em diferentes concentrações de gordura (integral e desnatado).

**Figura 7** – Distribuição das 68 partículas de MPs em formato de fragmentos confirmadas por microscopia de fluorescência após uso do corante Vermelho do Nilo, nas amostras de leite analisadas



Os resultados obtidos na análise de microscopia de fluorescência foram comparados sob quatro pontos de vista: conforme o processamento térmico do leite (UHT ou pasteurizado), conforme o teor de gordura (integral, desnatado e semidesnatado), conforme o tipo de embalagem das amostras (cartonada, PET e PEBD) e conforme as marcas selecionadas (11 no total). Quanto ao leite UHT, foram encontradas 314 partículas, sendo 36 fibras e 210 fragmentos, havendo a confirmação de 62 fragmentos como MPs. Já no leite pasteurizado, 30 partículas foram observadas, sendo 10 fibras e 20 fragmentos, confirmando-se seis fragmentos como potenciais MPs (Tabela 1).

**Tabela 1** – Comparação entre os resultados obtidos nas análises por microscopia óptica e de fluorescência entre as 44 amostras de leite, conforme os diferentes processamentos térmicos a que foram submetidos

	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas	Partículas suspeitas (microscopia óptica) L <sup>-1</sup>	Partículas confirmadas (Vermelho do Nilo) L <sup>-1</sup>	Carga* potenciais MPs L <sup>-1</sup>	Frequência de amostras positivas para potenciais MPs
<b>UHT</b>	36	19	314	62	3,26	52,78%
<b>Pasteurizado</b>	8	2	30	6	3	25%
<b>TOTAL</b>	44	21	344	68		

\*Carga MPs L<sup>-1</sup> = nº de MPs total de cada tipo de tratamento térmico/amostras positivas de cada tipo de tratamento térmico

Ao analisar as amostras separadamente conforme o teor de gordura, houve maior frequência de potenciais MPs em amostras de leite integrais, no entanto, a carga de potenciais MPs foi superior em amostras desnatadas (Tabela 2).

**Tabela 2** – Comparação entre os resultados obtidos nas análises por microscopia óptica e de fluorescência entre as 44 amostras de leite, conforme os diferentes teores de gordura

	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas	Partículas suspeitas (microscopia óptica) L <sup>-1</sup>	Partículas confirmadas (Vermelho do Nilo) L <sup>-1</sup>	Carga* potenciais MPs L <sup>-1</sup>	Frequência de amostras positivas para potenciais MPs
<b>Integral</b>	24	14	248	38	2,71	58,33%
<b>Desnatado</b>	18	7	84	30	4,28	35%
<b>Semidesnatado</b>	2	0	12	0	0	0%
<b>TOTAL</b>	44	21	344	68		

\*Carga MPs L<sup>-1</sup> = nº de MPs total de cada teor de gordura/amostras positivas de cada teor de gordura

Em relação aos tipos de embalagens, as amostras cartonadas apresentaram maior frequência e carga de potenciais MPs L<sup>-1</sup> (Tabela 3). Contudo, ressalta-se a distinção nas quantidades de embalagens comparadas, devido à disponibilidade no varejo, conforme segue: quatro amostras provenientes de embalagem PET, 32 armazenadas em embalagens cartonadas e oito em embalagem PEBD.

**Tabela 3** – Comparação entre os resultados obtidos nas análises por microscopia óptica e de fluorescência entre as 44 amostras de leite, conforme as diferentes embalagens em que são acondicionados

	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas	Partículas suspeitas (microscopia óptica) L <sup>-1</sup>	Partículas confirmadas (Vermelho do Nilo) L <sup>-1</sup>	Carga* potenciais MPs L <sup>-1</sup>	Frequência de amostras positivas para potenciais MPs
<b>Cartonada (UHT)</b>	32	18	276	60	3,33	56,25%
<b>PET (UHT)</b>	4	1	38	2	2	25%
<b>PEBD (pasteuriz.)</b>	8	2	30	6	3	25%

---

<b>TOTAL</b>	44	21	344	68
--------------	----	----	-----	----

---

**\*Carga MPs L<sup>-1</sup> = n° de MPs total de cada tipo de embalagem/amostras positivas de cada tipo de embalagem**

Dentre as marcas (Tabela 4), observa-se que apenas uma não apresentou potenciais MPs (marca 11, relativa a amostras de leite pasteurizado) e que a maior carga foi de 4,66 L<sup>-1</sup> (marca 4, relativa a amostras de leite UHT). As amostras de leite selecionadas para o estudo são processadas em grandes laticínios de distribuição ampla, inspecionados sob a esfera federal. A Figura 8 representa a distribuição das partículas suspeitas e confirmadas como potenciais MPs entre as amostras analisadas no estudo.

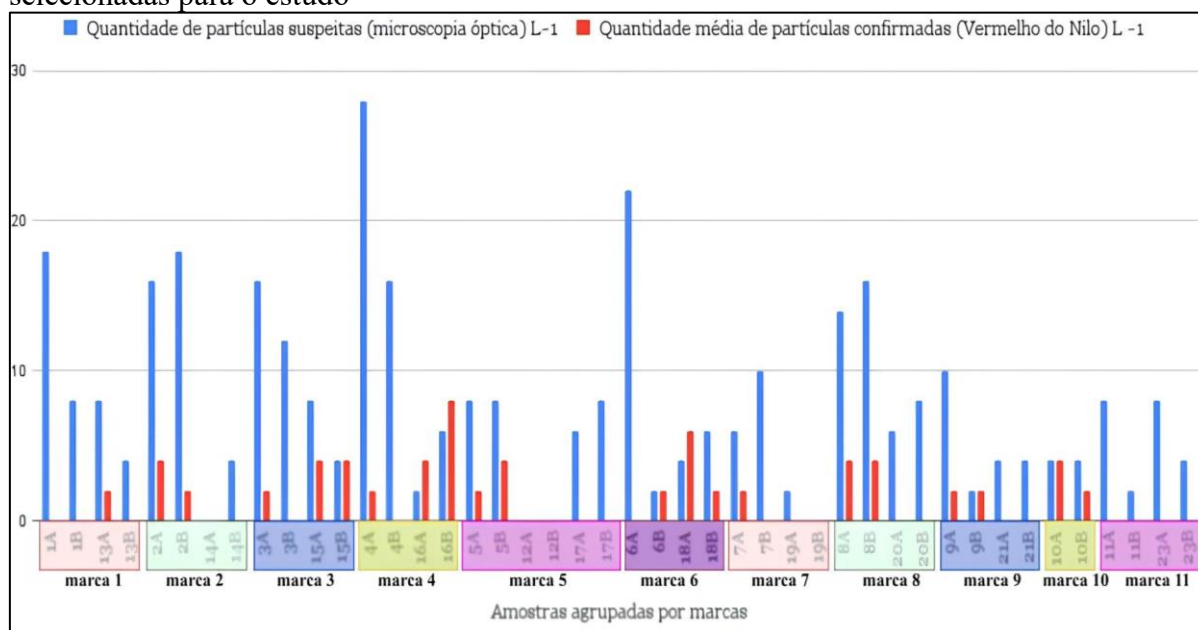
**Tabela 4** – Comparação entre os resultados obtidos nas análises por microscopia óptica e de fluorescência entre as 44 amostras de leite, conforme as diferentes marcas selecionadas

	<b>Nº de amostras analisadas</b>	<b>Nº de amostras positivas</b>	<b>Partículas suspeitas (microscopia óptica) L<sup>-1</sup></b>	<b>Partículas confirmadas (Vermelho do Nilo) L<sup>-1</sup></b>	<b>Carga* potenciais MPs L<sup>-1</sup></b>	<b>Frequência de amostras positivas para potenciais MPs</b>
<b>Marca 1 (1A, 1B, 13A, 13B)</b>	4	1	38	2	2	25%
<b>Marca 2 (2A, 2B, 14A, 14B)</b>	4	2	38	6	3	50%
<b>Marca 3 (3A, 3B, 15A, 15B)</b>	4	3	40	10	3,33	75%
<b>Marca 4 (4A, 4B, 16A, 16B)</b>	4	3	52	14	4,66	75%
<b>Marca 5 (5A, 5B, 12A, 12B, 17A, 17B)</b>	6	2	30	6	3	33,33%
<b>Marca 6 (6A, 6B, 18A, 18B)</b>	4	3	34	10	3,3	75%
<b>Marca 7 (7A, 7B, 19A, 19B)</b>	4	1	18	2	2	25%
<b>Marca 8 (8A, 8B, 20A, 20B)</b>	4	2	44	8	4	50%
<b>Marca 9 (9A, 9B, 21A, 21B)</b>	4	2	20	4	2	50%
<b>Marca 10 (10A, 10B)</b>	2	2	8	6	3	100%
<b>Marca 11 (11A, 11B, 23A, 23B)</b>	4	0	22	0	0	0%

TOTAL	44	21	344	68
-------	----	----	-----	----

\*Carga MPs L<sup>-1</sup> = n° de MPs total de cada marca/amostras positivas de cada marca

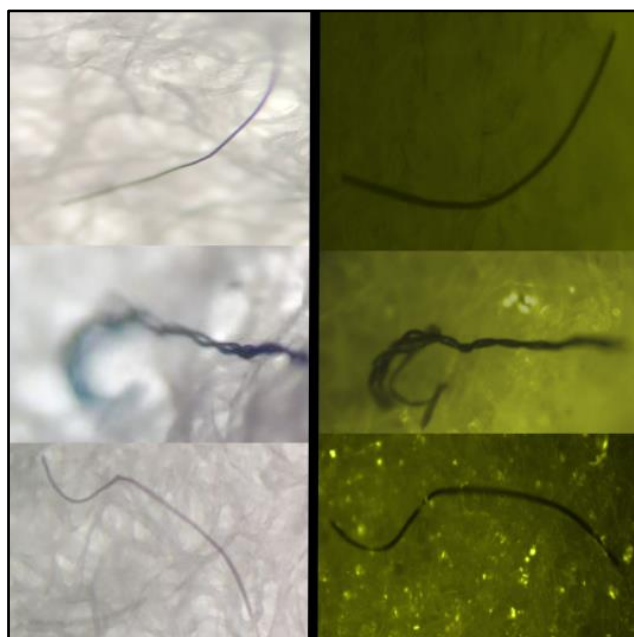
**Figura 8** – Distribuição de partículas suspeitas (detectadas por microscopia óptica) e partículas confirmadas como potenciais MPs (detectadas por microscopia de fluorescência após aplicação do corante Vermelho do Nilo), dentre as 44 amostras de leite de 11 marcas distintas selecionadas para o estudo



Sobre a diferença entre a quantidade de partículas observadas na microscopia óptica antes e depois da coloração com o Vermelho do Nilo, de fato mais da metade das fibras observadas previamente por microscopia óptica não foram detectadas posteriormente, bem como 14,92% dos fragmentos também se perderam de alguma forma ou modificaram o formato após os procedimentos de digestão e aplicação do corante, não correspondendo às imagens das partículas observadas em microscopia óptica. Cabe ressaltar a ausência de emissão de fluorescência por parte das fibras encontradas nas amostras (Figura 9), o que pode ser ocasionado pela não confirmação destas partículas como compostos plásticos, ou então por falhas na ligação do corante às fibras. Stanton e colaboradores (2019), relatam que o Vermelho do Nilo não gerou fluorescência em fibras de poliéster preta, acrílico azul ou poliamida vermelha em um estudo prévio, demonstrando que o corante pode não penetrar de forma confiável em todas as partículas de plástico e que a presença de corantes plásticos afeta a interação entre MPs e o Vermelho do Nilo. Isso pode ter acontecido no presente estudo, uma vez que as fibras observadas nas amostras submetidas ao corante eram resistentes ao contato da agulha e apresentavam colorações preta, azul, vermelha e marrom.

**Figura 9** – Exemplos de partículas em formato de fibras detectadas por microscopia óptica,

mas que não emitiram fluorescência na visualização em microscopia de fluorescência após a aplicação do corante Vermelho do Nilo



Fonte: os autores (2023)

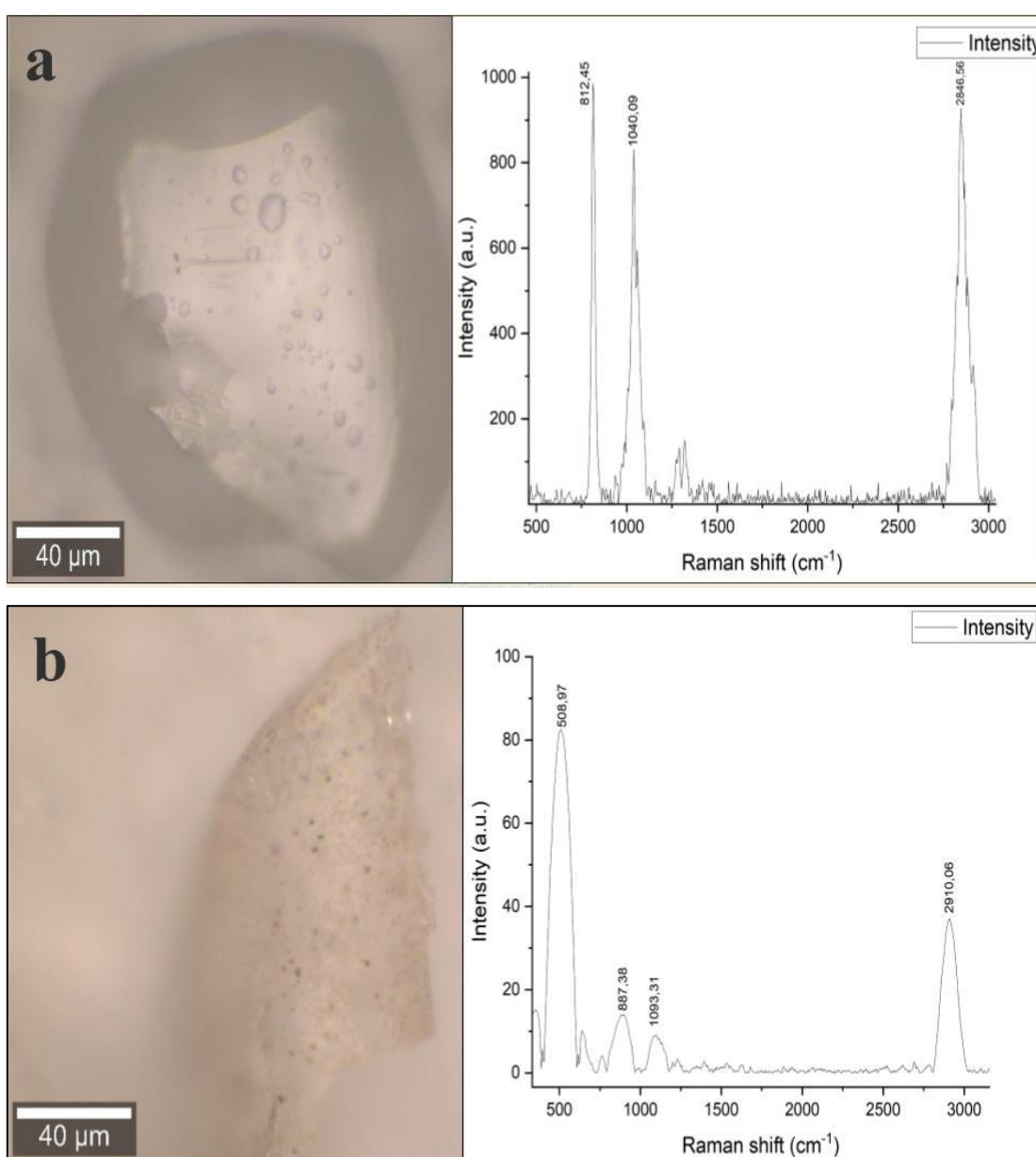
Ocorre que, com exigência de remoção de matéria orgânica para evitar a geração de resultados falso positivos, após a leitura inicial ao microscópio óptico, os filtros das amostras foram submetidos à aplicação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e exposição ao calor (Erni-Cassola et al., 2017). Então, deve-se considerar a possibilidade de degradação de partículas plásticas após esse tratamento, que pode causar danos como a descoloração e redução de peso e tamanho, prejudicando a detecção na técnica microscópica (Hurley et al., 2018; Duan et al., 2020). Essas informações revelam a possibilidade de subestimação dos resultados reais, necessitando de técnicas mais adequadas para acessar com mais confiabilidade a carga de MPs no leite.

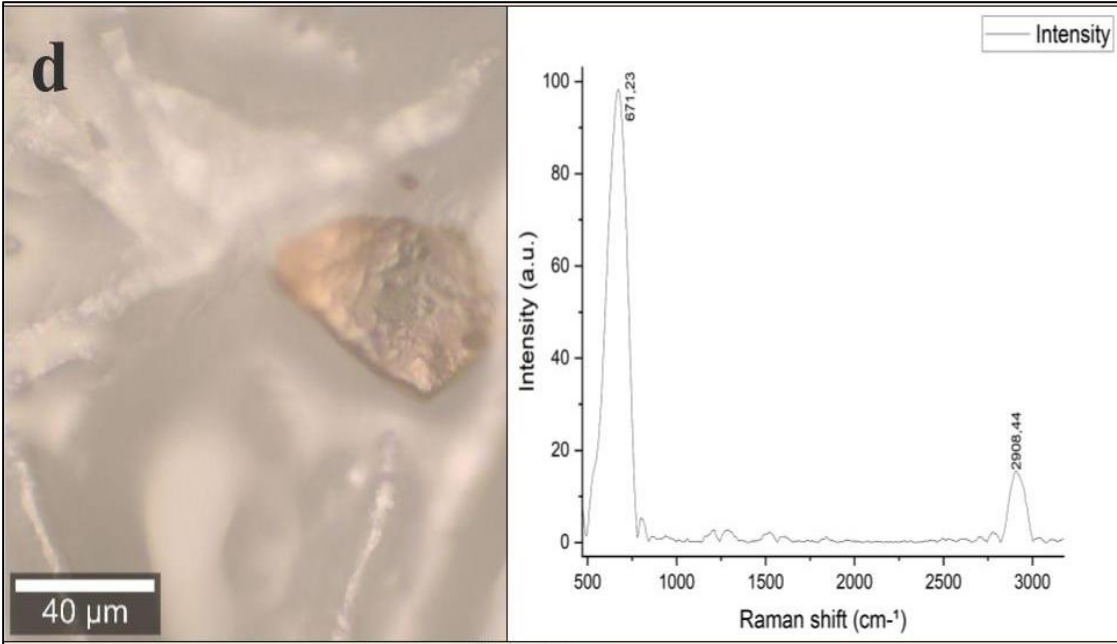
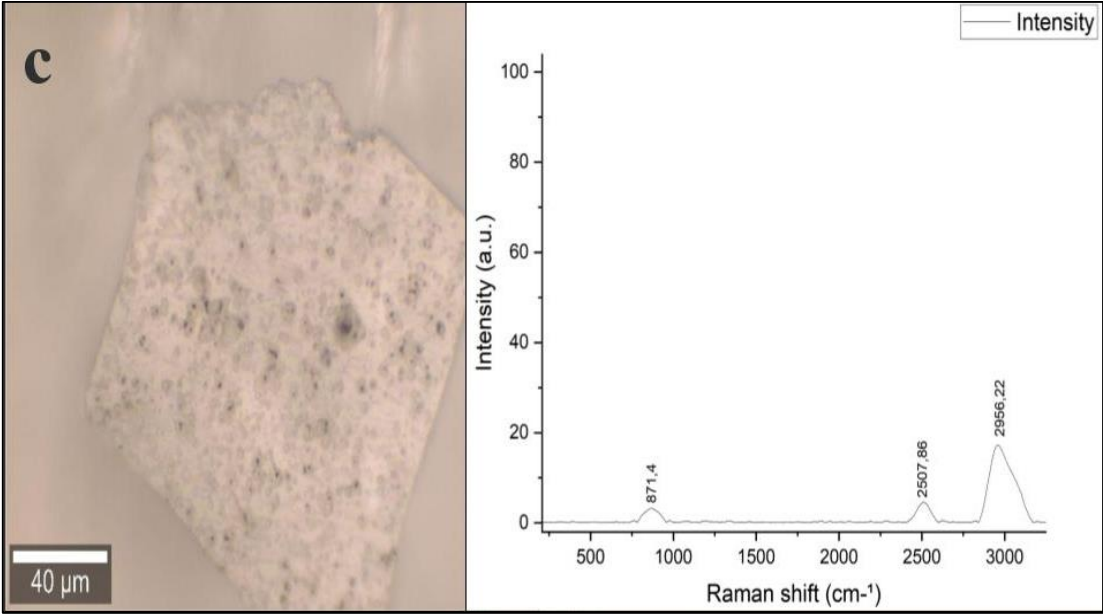
Sobre a carga de partículas encontrada nos leites com diferentes quantidades de gordura, supúnhamos que a maior concentração ocorreria em leite integral, no entanto a maior carga foi encontrada no leite desnatado. Um resultado inesperado sob o ponto de vista das interações químicas que as partículas plásticas poderiam ter com os glóbulos de gordura preservados nas versões integrais, devido à propriedade hidrofóbica desses contaminantes. As interações hidrofóbicas são associadas à agregação de moléculas apolares em superfícies apolares em um meio aquoso, como poderia ocorrer entre MPs e os glóbulos de gordura no leite (Prajapati et al., 2022; Hüffer and Hofmann 2016; Liu et al. 2019; Tourinho et al. 2019). Dessa forma, sugere-se que a carga de MPs no leite possa sofrer interferência de outros fatores, até então desconhecidos, que requerem maiores investigações para conclusão acerca

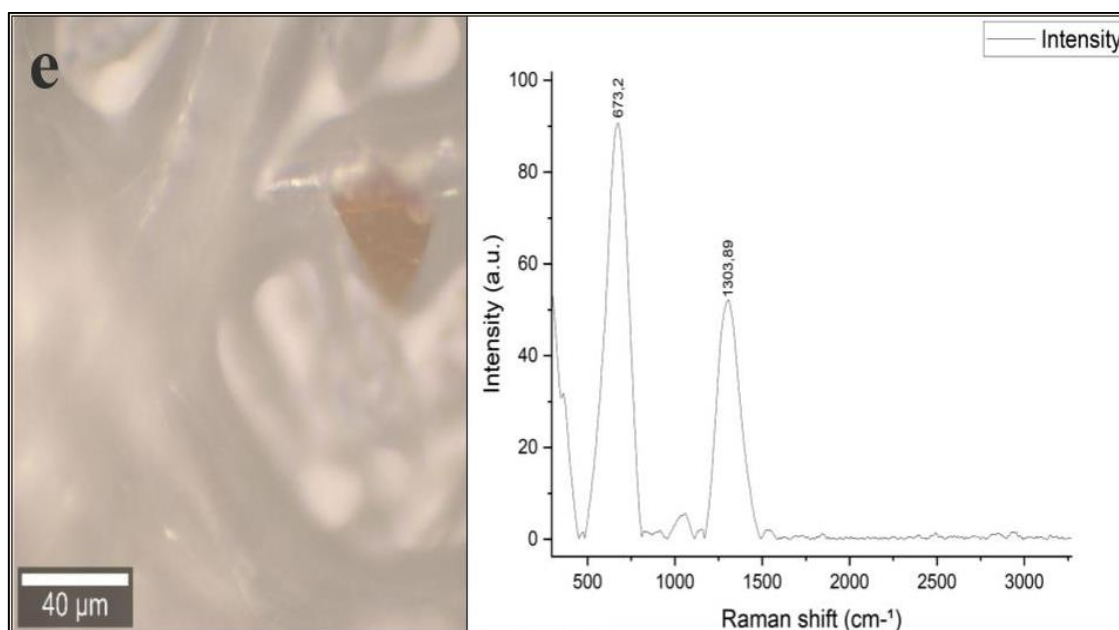
dessa informação.

Além disso, dentre as partículas suspeitas isoladas nos filtros que não receberam o corante Vermelho do Nilo foram submetidas à análise espectroscópica Raman, para a identificação da composição polimérica. Os espectros gerados e ajustados foram interpretados conforme a correlação com a base de dados pública Spectral Search (PublicSpectra) e aos dados disponíveis na literatura. Dessa forma, foram caracterizadas partículas orgânicas e inorgânicas (Figura 10).

**Figura 10** – Partículas orgânicas (a, b) e inorgânicas (c, d, e) submetidas à análise espectroscópica Raman provenientes das amostras de leite analisadas no estudo



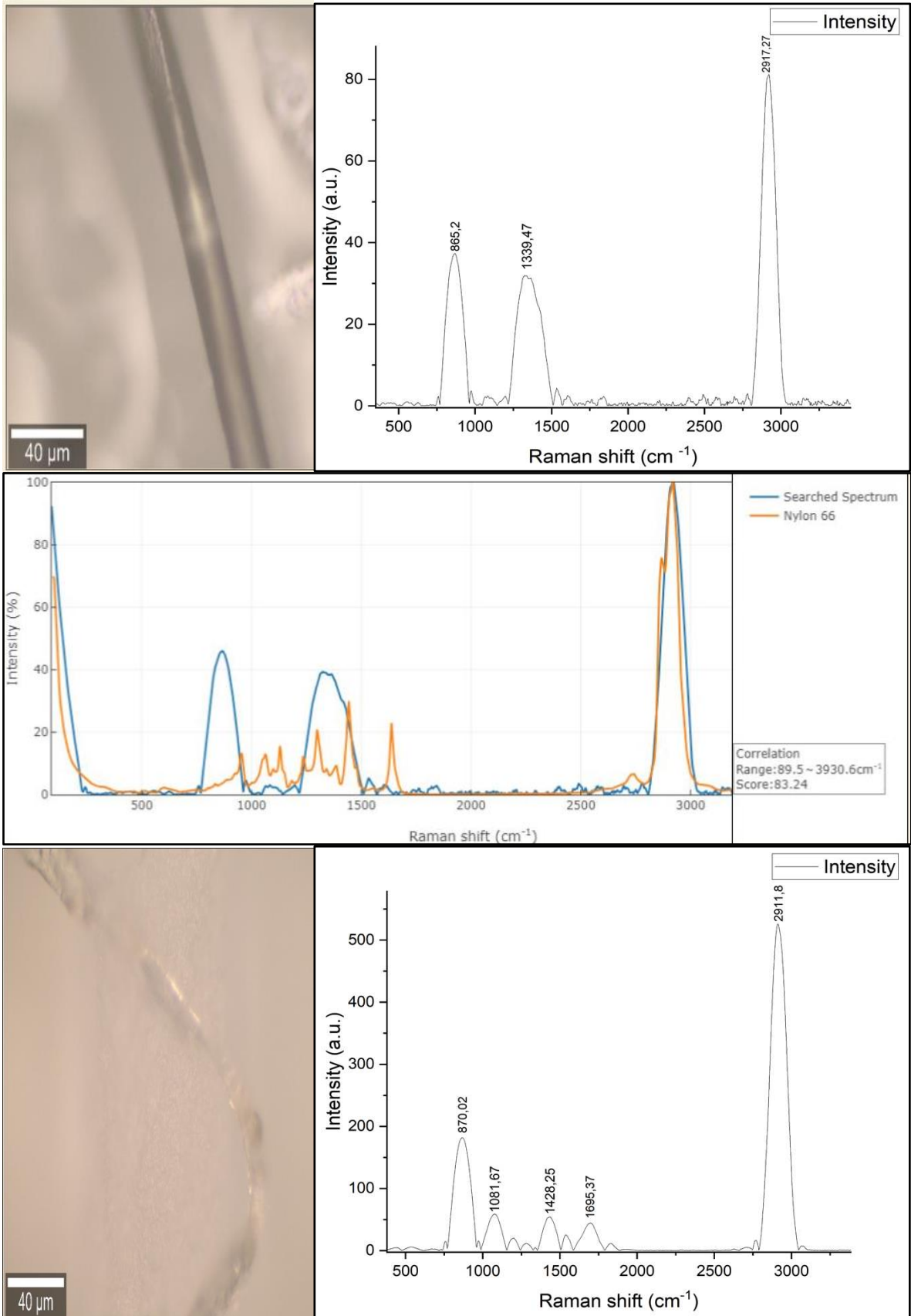


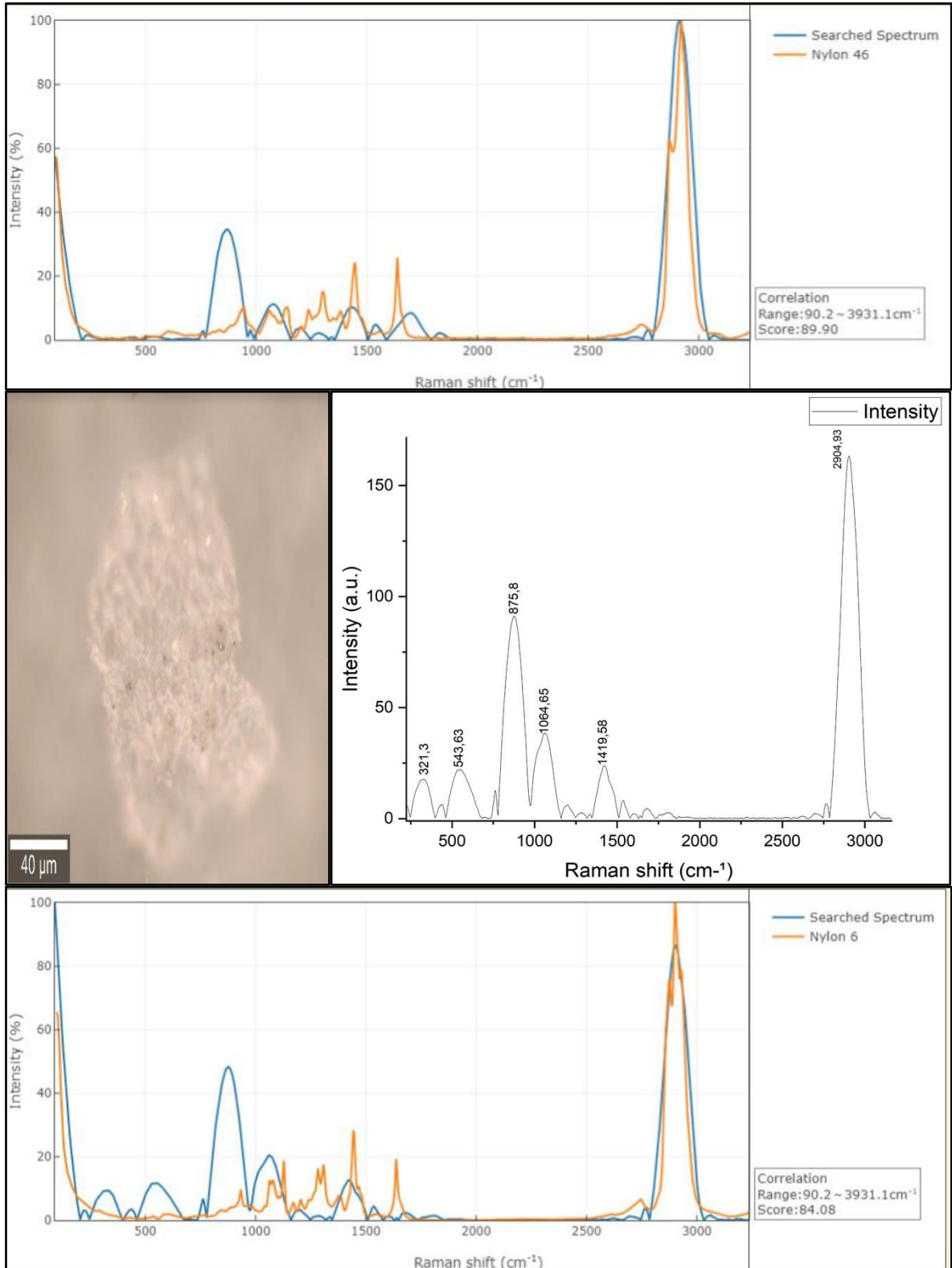


Fonte: os autores (2023)

Observadas ao Raman, as partículas identificadas como a e b na Figura 10 são orgânicas, sendo a primeira correlacionada como celulose, e a segunda como carbonato de etilmetilo. As demais partículas (c, d, e) foram reconhecidas como vidro. Dentre os polímeros plásticos, apenas a poliamida (Nylon 66, Nylon 46 e Nylon 6) foi detectada em três diferentes amostras de leite UHT integral, de duas marcas distintas (Figura 11). A poliamida já foi detectada em outros dois estudos envolvendo o leite (Basaran et al., 2023; Zhang et al., 2023). Para estimar a quantidade aproximada de MPs nas amostras, foi calculada a proporção entre partículas positivas e partículas suspeitas, que resultou em 15%. Ou seja, 15% das partículas de MPs do universo analisado são com certeza MPs. Considerando as 344 partículas observadas inicialmente por microscopia óptica, a frequência de 15% resultaria em aproximadamente 52 MPs, correspondendo a uma carga média de 2 MPs L<sup>-1</sup> dentre as amostras deste estudo. Os formatos de MPs detectados foram de fibras (predominantes) e fragmentos, com tamanho médio de 200 µm, variando entre 150 a 260 µm.

**Figura 11** – Partículas reconhecidas como poliamida (Nylon) na análise espectroscópica Raman, provenientes das amostras de leite analisadas no estudo





Fonte: os autores (2023)

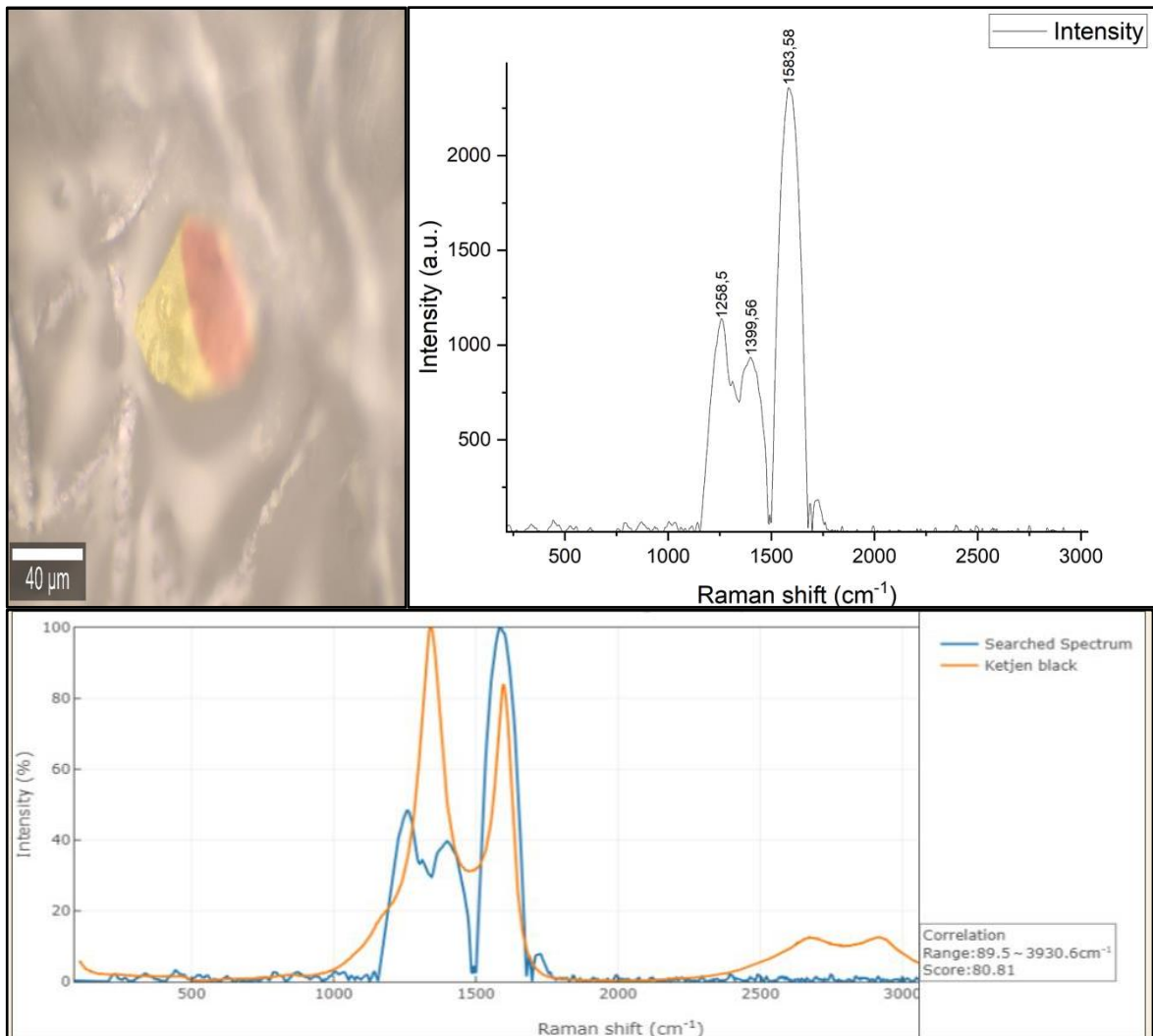
O baixo número de MPs observado no leite é um resultado previamente observado em alguns estudos. Ainda que o leite cru possa carregar MPs vindos da glândula mamária dos animais ou do contato com materiais plásticos dos componentes de ordenha, a filtração é um procedimento amplamente empregado no processamento desse alimento. Desde a fazenda o

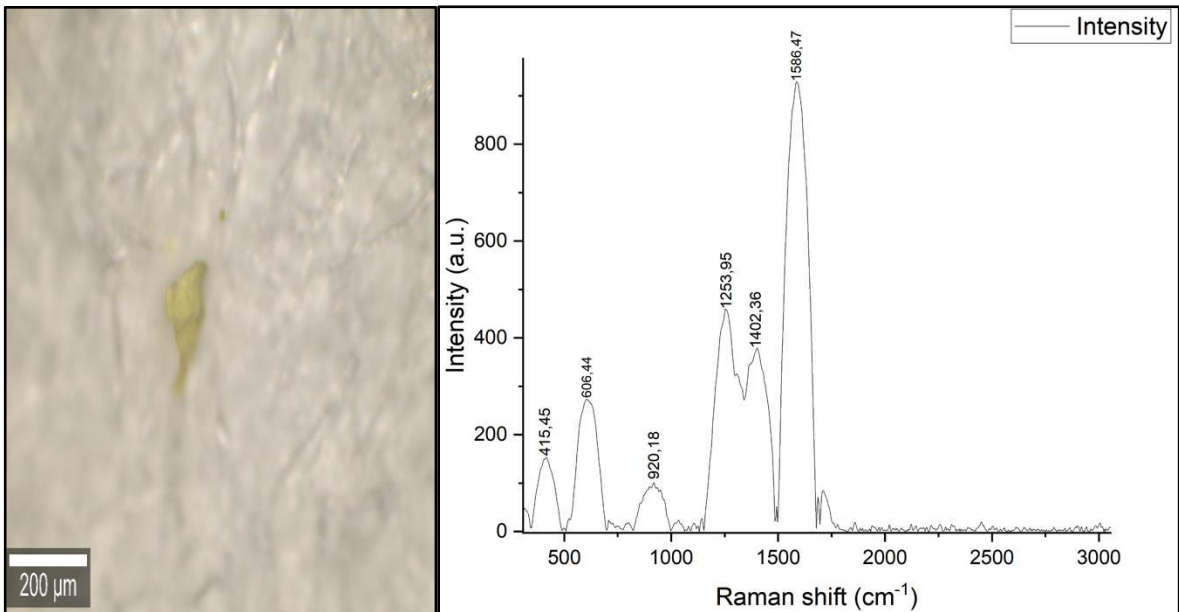
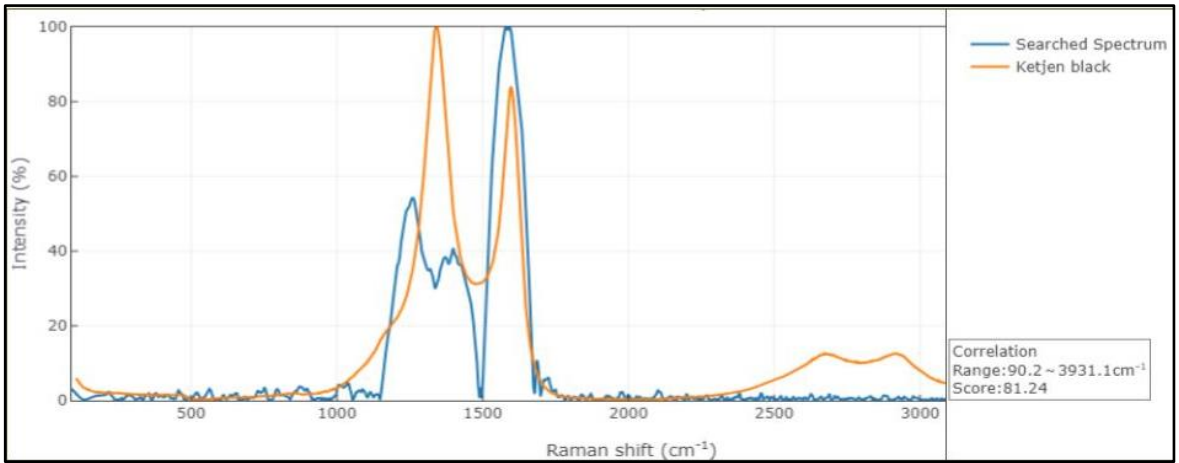
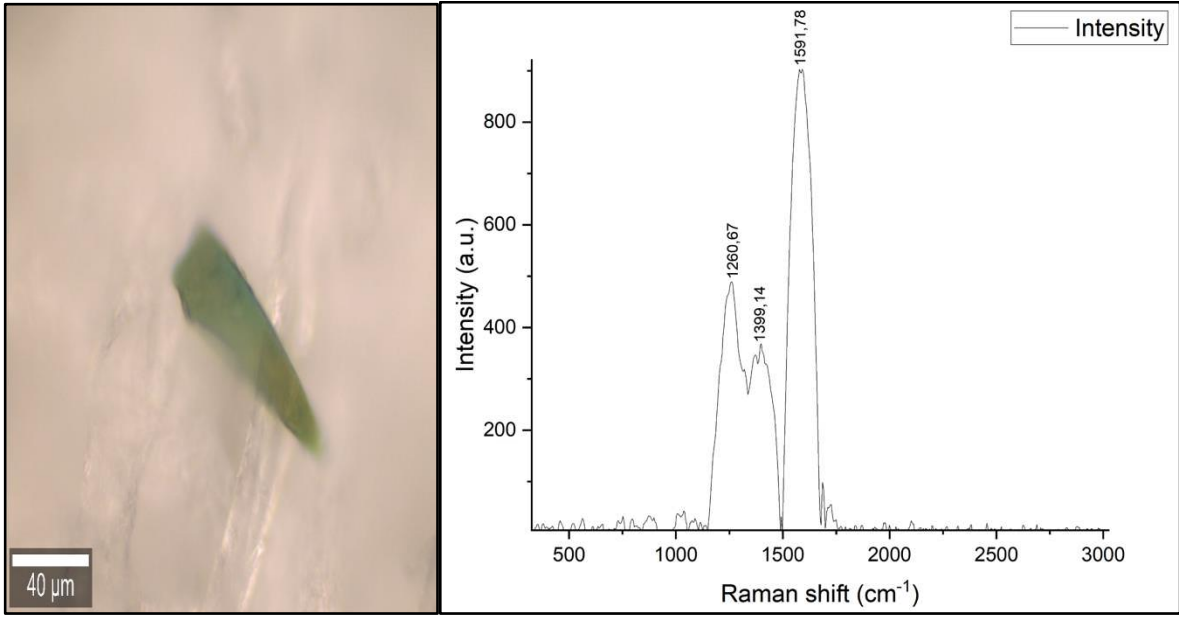
leite passa por filtros para a retenção de impurezas grosseiras, e na chegada aos laticínios é obrigatória a filtração mediante passagem sob pressão por material filtrante apropriado, antes de qualquer operação de pré-beneficiamento ou beneficiamento (BRASIL, 2017). A legislação brasileira, no entanto, não define tamanho mínimo da malha do elemento filtrante. No entanto, é importante destacar que os filtros compostos por polímeros plásticos são apontados também como fontes de MPs e nanoplásticos para o leite, apesar de também agirem reter diversos MPs maiores (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Prata & Dias-Pereira, 2023).

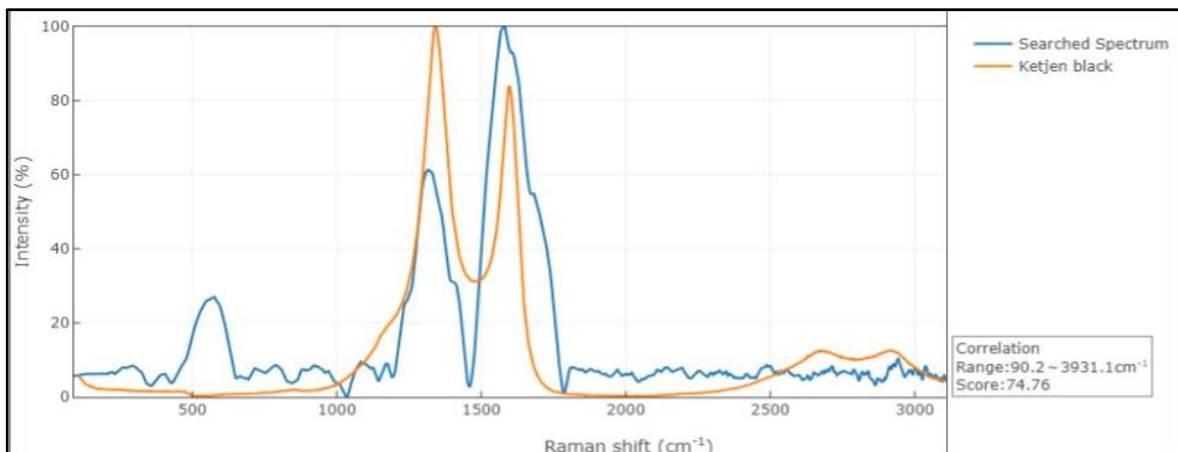
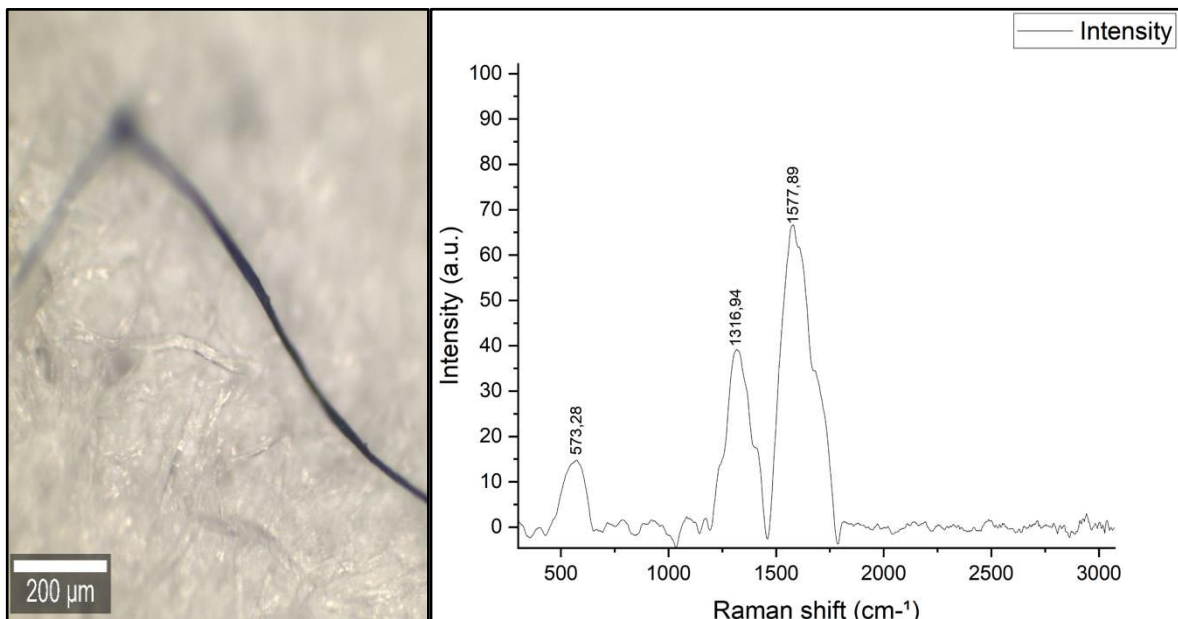
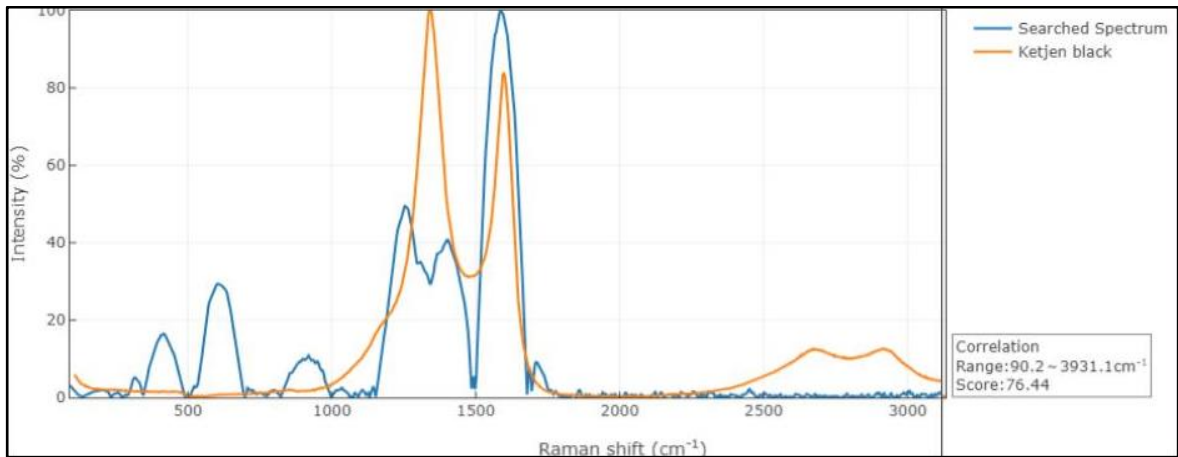
O leite pode ser submetido ainda a diferentes processos de filtração industrial, como a ultrafiltração e a microfiltração, cujos poros variam de tamanho conforme o que se deseja reter e em qual proporção. Os filtros de ultrafiltração podem apresentar poros entre  $10^{-2}$  a  $10^{-1}$   $\mu\text{m}$ , enquanto os de microfiltração, entre  $10^{-1}$  a  $10^1$   $\mu\text{m}$  (Malik et al., 2013), logo, estes filtros são capazes de reter grande parte das possíveis partículas de microplásticos no leite. A composição desses filtros também varia, sendo geralmente constituídos por materiais poliméricos ou misturas de polímeros (celulose, algodão, viscose e poliéster), cerâmicos ou de aço inoxidável. Os filtros de microfiltração são projetados para reter partículas indesejadas, como bactérias, esporos, células somáticas e impurezas, enquanto os de ultrafiltração são frequentemente usados para concentrar proteína e, ao mesmo tempo, reduzir açúcares e a lactose no permeado (Da Costa Filho et al., 2021).

Alguns espectros gerados acusaram a composição denominada *Ketjanblack* (Figura 12), um tipo de carbono negro (*carbon black*) com picos característicos que se concentram nas regiões 1050–1500  $\text{cm}^{-1}$ . O carbono negro é um aditivo comumente aplicado em materiais plásticos que pode mascarar a identificação dos MPs, e ao mesmo tempo indicar sua presença, como reportado por Rahman e colaboradores (2021), que enfrentaram esse desafio para identificar partículas nas amostras analisadas por espectroscopia Raman. As amostras que apresentaram tais partículas foram consideradas suspeitas para a contaminação por MPs no presente estudo, totalizando três amostras de leite UHT integral de três marcas distintas, além de terem sido observados também em uma amostra de leite UHT desnatado. A determinação da distribuição aproximada dessas partículas foi calculada, considerando a proporção de partículas positivas para carbono negro sobre o total de partículas analisadas em espectroscopia Raman, o que resultou em 25%. Considerando as 344 partículas observadas inicialmente por microscopia óptica, a frequência de 25% de partículas positivas para carbono negro corresponderia a aproximadamente 86 MPs suspeitos dentre as amostras deste estudo, com carga média de 2,5 MPs suspeitos  $\text{L}^{-1}$ .

**Figura 12** – Partículas com espectro reconhecido como *Ketjanblack* (aditivo carbono negro ou *carbon black*) na análise espectroscópica Raman, provenientes das amostras de leite analisadas no estudo





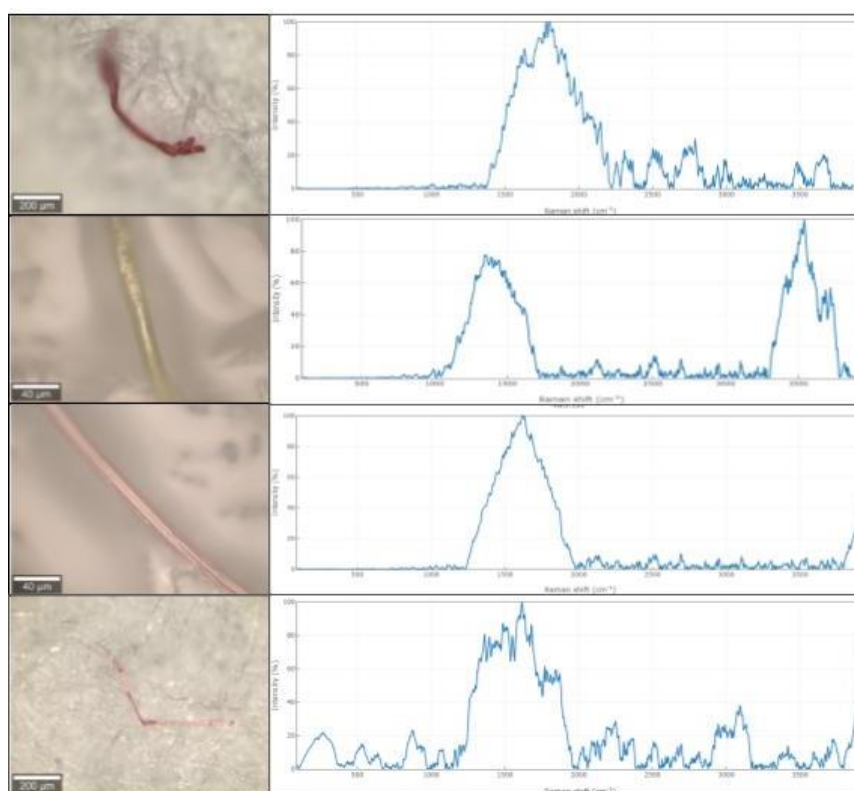


Fonte: os autores (2023)

Outra interferência na espectroscopia Raman foi a caracterização polimérica de partículas que geraram fluorescência no momento de aquisição do espectro (Figura 13). A fluorescência é um fenômeno comum em espectroscopia Raman que pode afetar a qualidade dos espectros obtidos, introduzindo ruído e dificultando a interpretação dos dados. Esse efeito ocorre

quando os materiais excitados pela radiação laser absorvem energia e emitem luz fluorescente, o que pode interferir nos sinais de Raman desejados (McCain et al., 2008). O comprimento de onda escolhido afetará a intensidade Raman, a resolução espacial e a fluorescência de fundo, e o único laser disponível para a geração dos espectros era o de comprimento de onda de 532 nm. O comprimento de onda do laser mais comumente usado na espectroscopia Raman é de 785 nm, que oferece baixa fluorescência e, ao mesmo tempo, mantém uma intensidade Raman relativamente alta. Infelizmente não foi possível alterar a configuração do laser utilizado na tentativa de reduzir a interferência dos efeitos de fluorescência no presente estudo, devido à indisponibilidade do laser de 785 nm.

**Figura 13** – Partículas e seus respectivos espectros com ruídos de fluorescência na análise espectroscópica Raman, provenientes das amostras de leite analisadas no estudo



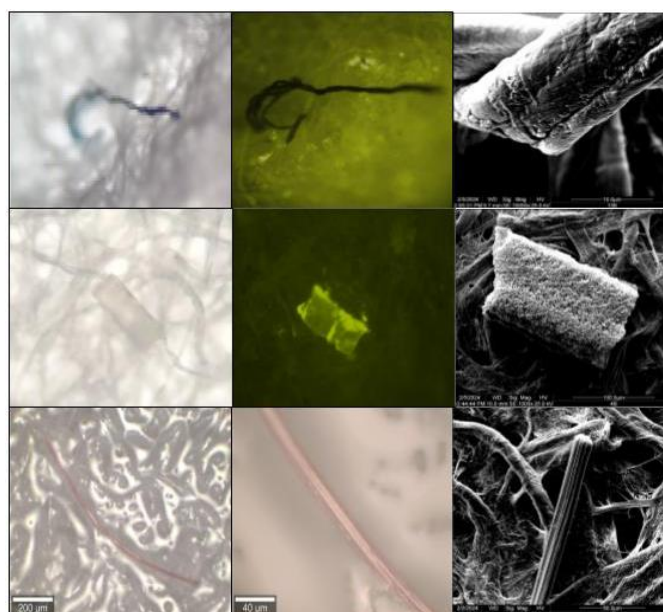
Fonte: os autores (2023)

Ressalta-se que a partícula fluorescente “a” gerou um baixo *score* de identificação na base de dados Public Spectra (13,44) para polietileno tereftalato (PET). Seguindo o mesmo critério adotado para as partículas referidas como carbono negro, as amostras que resultaram em partículas com espectros fluorescentes foram denominadas como suspeitas para contaminação por MPs, devido ao fato da impossibilidade da caracterização dos espectros, provavelmente devido à pigmentação nelas observada. Nesse caso, três amostras de leite UHT integral de três marcas distintas foram consideradas suspeitas, bem como uma amostra

de leite pasteurizado semidesnatado. O mesmo procedimento de determinação da distribuição aproximada de partículas foi aplicado nesse caso, uma vez que também há chances de tratar-se de MPs. A proporção de partículas fluorescentes considerando o total de partículas suspeitas foi similar ao resultado observado nas partículas caracterizadas como carbono negro (25%), com a quantidade aproximada de 86 MPs dentre todas as amostras deste estudo, também com carga média de 2,5 MPs suspeitos  $L^{-1}$ .

A fim de enriquecer as informações acerca das características das partículas, três delas foram selecionadas para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Esse método permite a análise detalhada da estrutura da superfície, o que é inacessível nas análises de microscopia óptica e de fluorescência. Por meio dessa técnica, foram observadas as características de superfície em alta resolução (Figura 14).

**Figura 14** – Partículas analisadas por diferentes técnicas microscópicas, sendo a MEV a que permite a observação mais detalhada da superfície, provenientes das amostras de leite analisadas no estudo



Fonte: os autores (2023)

Duas partículas selecionadas eram provenientes da análise de microscopia de fluorescência, ou seja, aquelas que interagiram positivamente com o corante Vermelho do Nilo. Devido à impossibilidade de acessar a composição polimérica pela técnica espectroscópica Raman dessas três partículas, por conta da geração de ruídos ao aplicar o laser no comprimento de onda 532 nm, decidiu-se por visualizar os detalhes destas por MEV. Observa-se que as duas partículas provenientes da técnica de fluorescência apresentam superfície rugosa e áspera, enquanto a terceira fibra é constituída por uma série de estruturas tubulares unidas e lisas, sem poros e sem aparência áspera. As partículas selecionadas não apresentam quebras na

superfície, mas as partículas fluorescentes têm as bordas desgastadas. Achados de superfícies mais ásperas e bordas desgastadas podem indicar o envelhecimento de MPs após a exposição aos agentes externos (Shruti et al., 2023).

Apesar das limitações enfrentadas no desenvolvimento do estudo, a caracterização dos MPs coincide em alguns parâmetros com os resultados de estudos anteriores que empregaram filtro de porosidade 10 ou 11  $\mu\text{m}$  para o isolamento de MPs no leite (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Kiruba et al., 2022; Basaran et al., 2023). Caso a carga média de MPs desse estudo considerasse apenas os resultados confirmados como poliamida inicialmente relatados, o resultado obtido seria de 2 MPs  $\text{L}^{-1}$ . Ao incluirmos as proporções de partículas suspeitas de serem MPs (aquelas positivas para carbono negro e as partículas que geraram ruído no espectro por fluorescência), a carga média poderia alcançar o resultado de 2,6 MPs  $\text{L}^{-1}$ , ou seja, cargas inferiores àquela obtida na análise de microscopia de fluorescência (3,24 partículas  $\text{L}^{-1}$ ). A baixa quantidade de MPs aqui observada, ainda com a possibilidade de subestimação, foi também relatada por Kutralam-Muniasamy e colaboradores (2020), que calcularam a presença média de  $6.5 \pm 2.3$  partículas  $\text{L}^{-1}$ , bem como por Basaran e colaboradores (2023), que detectaram  $6 \pm 5$  partículas  $\text{L}^{-1}$ . Por outro lado, Kiruba e colaboradores (2022) reportam um valor muito maior, entre 164-427 partículas  $\text{L}^{-1}$ . Dessa maneira, reforça-se a necessidade de análises mais aprimoradas para a confirmação da quantificação.

As cores reportadas nestes estudos também eram diversas, entre quatro e seis variedades, enquanto 10 variedades de cores foram observadas entre as amostras do presente trabalho. Os formatos citados incluem fibras, fragmentos e *pellets*, porém os relatos mais frequentes são de fibras, diferente do presente estudo, em que os fragmentos foram predominantes (Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Basaran et al., 2022).

Mesmo a carga de contaminação por MPs aparentando ser inferior no leite, quando comparada às observadas em outras bebidas (Kutralam-Muniasamy et al., 2020), é importante o rastreamento da contaminação de forma a determinar sua origem, investigando com maiores detalhes as etapas de filtração e o material predominantemente empregado nos filtros das indústrias de laticínios. Isso possibilitará a implantação de práticas que ajudem a eliminar, ou ao menos reduzir esse problema. Além dos potenciais riscos à saúde relacionados aos MPs que vêm sendo debatidos, a excessiva produção e descarte de embalagens como as do leite parecem contribuir tanto para a exposição humana aos MPs, como para a poluição ambiental, visto a ainda corrente dificuldade na reciclagem de embalagens cartonadas vastamente utilizadas na indústria de laticínios.

## Conclusão

Os MPs estão disseminados no leite pasteurizado e UHT de praticamente todas as marcas estudadas na região onde o estudo foi desenvolvido, tanto nas versões integrais, como naquelas com menor teor de gordura. No entanto, a carga contaminante aparenta ser pequena. Nas análises por fluorescência com Vermelho do Nilo, a maior carga de MPs foi observada em leite desnatado, e o leite UHT apresentou maior frequência de amostras positivas em comparação ao leite pasteurizado. As partículas mais frequentes foram fragmentos e fibras, de tamanho médio de 150  $\mu\text{m}$  e coloração variada. Todas as técnicas utilizadas apresentaram imprecisões, a microscopia ótica superestima a quantidade, a microscopia de fluorescência com o Vermelho do Nilo apresenta falsos positivos e negativos. A espectroscopia Raman permitiu caracterizar a composição polimérica de algumas partículas do estudo, porém, sofre diversas interferências e pode subestimar resultados. A microscopia eletrônica de varredura é inviável para um estudo dessa dimensão, no sentido de caracterizar todas as partículas suspeitas. O desenvolvimento de uma técnica que possa aliar facilidade e maior precisão nos resultados, faz-se urgente e necessária, uma vez que o monitoramento das taxas de contaminação deve ser contínuo. Outros estudos que determinem pontos de contaminação por MPs na cadeia de produção do leite também são desejáveis.

## Referências

- ALIMBA, C.G., FAGGIO, C., SIVANESAN, S., OGUNKANMI, A.L., KRISHNAMURTHI, K. Micro(nano)-plastics in the environment and risk of carcinogenesis: Insight into possible mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, v. 416, n.126143, ago 2021.
- ATUGODA, T., VITHANAGE, M., WIJESEKARA, H., BOLAN, N., SARMAH, A.K., BANK, M.S., YOU, S., OK, Y.S. Interactions between microplastics, pharmaceuticals and personal care products: Implications for vector transport. *Environment International*, v. 149, n. 2021, p. 1-21, abr 2021.
- BARCELÓ, D., PICÓ, Y., ALFARHAN, A.H. Microplastics: Detection in human samples, cell line studies, and health impacts. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.101, n.104204, p.1-16, ago 2023.
- BASARAN, B., ÖZÇİFÇİ, Z., AKCAY, H.T., AYTAN, Ü. Microplastics in branded milk: Dietary exposure and risk assessment. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 123, n. 2023, p. 1-10, out 2023.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de

março de 2017. Dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, instituídas pela Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e pela Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989. Brasília, 2017.

DA COSTA FILHO, P.A., ANDREY, D., ERIKSEN, B. et al. Detection and characterization of small-sized microplastics ( $\geq 5 \mu\text{m}$ ) in milk products. *Scientific Reports*, v. 11, n. 24046, dez 2021.

DIAZ-BASANTES, M.F., CONESA, J.A., FULLANA, A. Microplastics in Honey, Beer, Milk and Refreshments in Ecuador as Emerging Contaminants. *Sustainability*, v. 12, n. 14, p. 1-17, mai 2020.

DRIS, R., GASPERI, J., MIRANDE, C., MANDIN, C., GUERROUACHE, M., LANGLOIS, V., TASSIN, B. A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments. *Environmental Pollution*, v. 221, p. 453-458, fev 2017.

DUAN, J., HAN, J., ZHOU, H., LAU, Y.L., AN, W., WEI, P., CHEUNG, S.G., YANG, Y., TAM, N.F. Development of a digestion method for determining microplastic pollution in vegetal-rich clayey mangrove sediments. *Science of The Total Environment*, v. 707, 2020.

ERNI-CASSOLA, G., GIBSON, M.I., THOMPSON, R.C., CHRISTIE-OLEZA, J.A. Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20  $\mu\text{m}$ ) in Environmental Samples. *Environmental Science & Technology*, v. 51, n. 23, p. 13641-13648, nov 2017.

GEYER, R., JAMBECK, J.R., LAW, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, v. 3, n. 7, p. 1-5, jul 2017.

GEYER, R. A brief history of plastic. In: BIANCHI, M.S.; CIMADEVILA, M., TRETTNAK, W. *Mare Plasticum: The Plastic Sea*. 1st edition. Berlin: Springer, 2020. p. 31–47.

HÜFFER, T., WENIGER, A.K., HOFMANN, T. Sorption of organic compounds by aged polystyrene microplastic particles. *Environmental Pollution*, v. 236, p. 218–225, 2016.

HURLEY, R.R., LUSHER, A.L., OLSEN, M., NIZZETTO, L. Validation of a Method for Extracting Microplastics from Complex, Organic-Rich, Environmental Matrices. *Environmental Science and Technology*, v. 52, n. 13, p. 7409–7417, 2018.

JAMBECK, J.R., GEYER, R., WILCOX, C., SIEGLER, T.R., PERRYMAN, M., ANDRADY, A., NARAYAN, R., LAW, K.L. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, v. 347, n. 6223, p. 768–771, fev 2015.

- KIRUBA, R., PREETHI, M., AGANASTEEN, R., RAJ, R.M., THABITHA, H.C., MONICA, P., SAKTHIVEL, J., LEVINCE, C., BANU, N.I. Identification of Microplastics as Emerging Contaminant in Branded Milk of Tamil Nadu State, India. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, v. 11, n. 1, p. 181-187, jan-abr 2022.
- KUTRALAM-MUNIASAMY, G., PÉREZ-GUEVARA, F., ELIZALDE-MARTÍNEZ, I., SHRUTI, V.C. Branded milks – Are they immune from microplastics contamination? *Science of The Total Environment*, v. 714, n. 2020, p.1-10, abr 2020.
- LIU, G., ZHU, Z., YANG, Y., SUN, Y., YU, F., MA, J. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater. *Environmental Pollution*, v. 246, p. 26–33, 2019.
- MALIK, A.A., KOUR, H., BHAT, A., KAUL, R.K., KHAN, S., KHAN, S.U. Commercial Utilization of Membranes in Food Industry. *International Journal of Food Nutrition and Safety*, v.3, n.3, p.147-170, mai 2013.
- MCCAIN, S.T., WILLETT, R.M., BRADY, D.J. Multi-excitation Raman spectroscopy technique for fluorescence rejection. *Optics Express*, v.16, n.15, p.10975-10991, 2008.
- NAPPER, I.E., THOMPSON, R.C. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: effects of fabric type and washing conditions. *Marine Pollution Bulletin*, v. 112, n.1, p. 39–45, nov 2016.
- PLASTICS EUROPE. *Plastics - the Fast Facts 2023*. Disponível em: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>. Acesso em: 01 dez. 2023.
- PRAJAPATI, A., VAIDYA, A.N., KUMAR, A.R. Microplastic properties and their interaction with hydrophobic organic contaminants: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, p. 49490–49512, 2022.
- PRATA, J.C., DA COSTA, J.P., LOPES, I., DUARTE, A.C., ROCHA-SANTOS, T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of The Total Environment*, v. 702, n. 1, p. 1-9, fev 2020.
- PRATA, J.C., DIAS-PEREIRA, P. Microplastics in Terrestrial Domestic Animals and Human Health: Implications for Food Security and Food Safety and Their Role as Sentinels. *Animals*, v. 13, n. 4, p. 1-12, fev 2023.
- PRATA, J.C., REIS, V., DA COSTA, J.P., MOUNERYAC, C., DUARTE, A.C., ROCHA-SANTOS, T. Contamination issues as a challenge in quality control and quality assurance in microplastics analytics. *Journal of Hazardous Materials*, v. 403, n. 2021, p. 1-8, fev 2021.

- QIAO, R., DENG, Y., ZHANG, S., WOLOSKER, M. B., ZHU, Q., REN, H., ZHANG, Y. Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere*, v. 236, n. 2019, p. 1-1, dez 2019.
- RAHMAN, A., SARKAR, A., YADAV, O.P., ACHARI, G., SLOBODNIK, J. Potential human health risks due to environmental exposure to nano- and microplastics and knowledge gaps: A scoping review. *Science of The Total Environment*, v. 757, n. 2021, p. 1-13, fev 2021.
- RAGUSA, A., NOTARSTEFANO, V., SVELATO, A., BELLONI, A., GIOACCHINI, G., BLONDEEL, C., ZUCHELLI, E., DE LUCA, C., D'AVINO, S., GULOTTA, A., CARNEVALI, O., GIORGINI, E. Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. *Polymers*, v.14, n.13, p.1-14, jun 2022.
- RAGUSA, A., SVELATO, A., SANTACROCE, C., CATALANO, P., NOTARSTEFANO, V., CARNEVALI, O., PAPA, F., RONGIOLETTI, M.C.A., BAIOTTO, F., DRAGHI, S., D'AMORE, E., RINALDO, D., MATTA, M., GIORGINI, E. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, v. 146, jan 2021.
- SCHOLZ-AHRENS, K.E., AHRENS, F., BARTH, C.A. Nutritional and health attributes of milk and milk imitations. *European Journal of Nutrition*, v. 59, p. 19-34, 2020.
- SCHWABL, P., KOPPEL, S., KONIGSHOFER, P., BUCSICS, T., TRAUNER, M., REIBERGER, T., LIEBMANN, B. Detection of Various Microplastics in Human Stool. *Annals of Internal Medicine*, v. 171, n. 7, p. 453-458, 2019.
- SHRUTI, V.C., KUTRALAM-MUNIASAMY, G., PÉREZ-GUEVARA, F., ROY, P.D., ELIZALDE-MARTINEZ, I. First evidence of microplastic contamination in ready-to-use packaged food ice cubes. *Environmental Pollution*, v.318, n. 120905, fev 2023.
- SILVA-CAVALCANTI, J.S., SILVA, J.D.B., FRANÇA, E.J., ARAÚJO, M.C.B., GUSMÃO, F. Microplastics ingestion by a common tropical freshwater fishing resource. *Environmental Pollution*, v. 221, n. 2017, p. 218-226, fev 2017.
- STANTON, T., JOHNSON, M., NATHANAIL, P., GOMES, R.L., NEEDHAM, T., BURSON, A. Exploring the Efficacy of Nile Red in Microplastic Quantification: A Costaining Approach. *Environmental Science & Technology Letters*, v. 6, n. 10, p. 565-636, out 2019.
- TOURINHO, P.S., KOČÍ, V., LOUREIRO, S., VAN GESTEL, C.A.M. Partitioning of chemical contaminants to microplastics: Sorption mechanisms, environmental distribution and effects on toxicity and bioaccumulation. *Environmental Pollution*, v. 252, n.2019 p. 1246-1256, jun 2019.

YANG, Y., XIE, E., DU, Z., PENG, Z., HAN, Z., LI, L., ZHAO, R., QIN, Y., XUE, M., LI, F., HUA, K., YANG, X. Detection of Various Microplastics in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *Environmental Science & Technology*, v. 57, n. 30, p. 10911-10918, jul 2023.

ZHANG, Q., LIU, L., JIANG, Y., ZHANG, Y., FAN, Y., RAO, W., QIAN, X. Microplastics in infant milk powder. *Environmental Pollution*, v. 323, n. 2023, p 1-8, abr 2023.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO

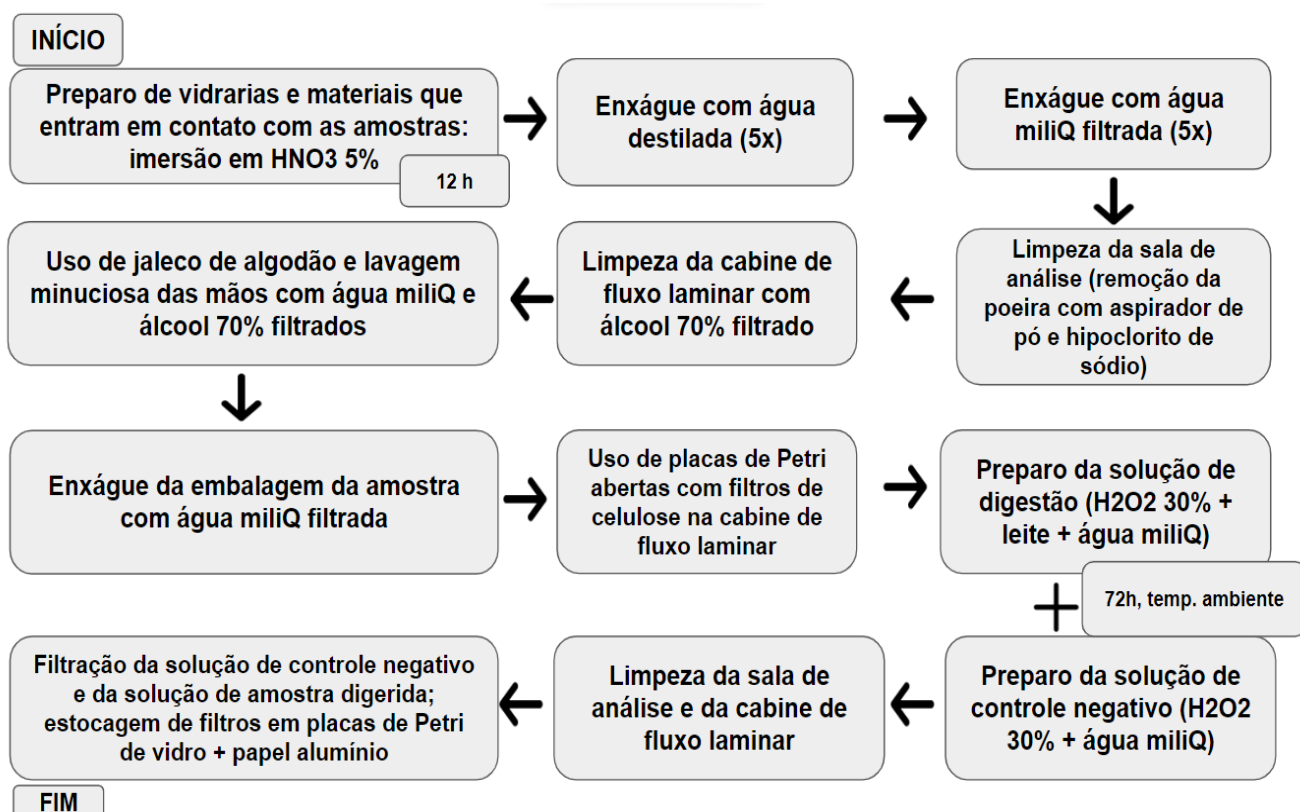
A contaminação do leite fluído comercializado para consumo humano por MPs foi acessada no presente estudo por meio de técnicas microscópicas associada à observação de fluorescência, além da técnica de microscopia eletrônica de varredura e técnica espectroscópica Raman, uma das mais eficientes para a geração de resultados na área estudada. Todas as variedades de leite testadas (UHT e pasteurizado, integral e desnatado) apresentaram partículas fluorescentes (potenciais MPs), havendo um ligeiro aumento da carga observada em leite desnatado em comparação ao leite integral. De forma geral, o formato de fragmento e partículas translúcidas foram os padrões mais observados. Por meio da espectroscopia Raman, apenas amostras de leite UHT integral tiveram a confirmação de contaminação por MPs (poliamida), com carga média inferior àquela obtida pela análise de microscopia de fluorescência. A microscopia eletrônica de varredura permitiu a observação do estado de conservação da superfície de algumas partículas sob suspeita, além de informar, de maneira qualitativa, a possibilidade do material ser considerado plástico.

Recomenda-se estudos semelhantes para confirmação das cargas de MPs em leite fluído, além dos derivados lácteos, principalmente aqueles submetidos a mais etapas de processamento e manipulação. A qualidade da água e do ar das fazendas e das indústrias em relação à contaminação por MPs são outros pontos a serem considerados para futuros estudos, auxiliando inclusive para o entendimento dos pontos mais significativos de incorporação de MPs ao leite e derivados. Além disso, a consideração dos tipos de filtração aplicadas às diferentes marcas de leite e as características atreladas ao processo de filtração também podem fornecer informações valiosas e auxiliarão na caracterização desse problema na região. Isso permitirá a adoção de medidas de contenção da liberação de MPs para os alimentos, preservando a saúde humana de possíveis perigos relacionados à ingestão desses contaminantes.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A

Fluxo de atividades executadas para a obtenção dos filtros com MPs isolados



Fonte: a própria autora (2023)

## APÊNDICE B

### Tratamento de digestão aplicado às amostras

Todas as amostras do estudo passaram por digestão oxidativa com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%, durante 72 horas (Diaz-Basantes et al., 2020). As amostras selecionadas no presente estudo eram integrais (teor de gordura ≥3%), desnatadas (≤0,5%) e semidesnatadas (teor de gordura ≥ 0,6% e ≤ 2,9%), como indicado no quadro abaixo.

**Quadro 1** - Identificação de amostras integrais, quanto ao tipo de processamento e o teor de gordura (%)

Identificação da amostra	Tipo de processamento térmico do leite	Teor de gordura
1A	UHT	3%
1B		
2A	UHT	
2B		
3A	UHT	
3B		
4A	UHT	
4B		
5A	UHT	
5B		
6A	UHT	
6B		
7A	UHT	
7B		
8A	UHT	
8B		
9A	UHT	
9B		

10A	Pasteurizado	
10B		
11A	Pasteurizado	
11B		
12A	Pasteurizado	
12B		

Fonte: a própria autora (2023)

**Quadro 2** - Identificação de amostras desnatadas e semidesnatadas, quanto ao tipo de processamento e o teor de gordura (%)

Identificação da amostra	Tipo de processamento do leite	Teor de gordura	Média geral do teor de gordura das amostras
13A	UHT	0%	0,11%
13B			
14A	UHT	0,2%	
14B			
15A	UHT	0%	
15B			
16A	UHT	0%	
16B			
17A	UHT	0%	
17B			
18A	UHT	0,2%	
18B			
19A	UHT	0,5%	
19B			
20A	UHT	0%	
20B			
23A	Pasteurizado	2,5%	
23B			

Fonte: a própria autora (2023)

Baseando-se nos teores de gordura apresentados, adaptou-se o método de digestão oxidativa relatado previamente, uma vez que aquele foi aplicado somente em leite “*low fat*”. Dessa forma, considerou-se para os cálculos o teor de gordura de 1% para o leite “*low fat*” no estudo de referência, por ser esse o valor mais comumente observado entre os leites semidesnatados disponíveis no varejo brasileiro. Na sequência, procedeu-se o cálculo do volume necessário de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% para as versões integral e desnatada analisadas no presente estudo, conforme segue:

Considerando os volumes relatados de 200 mL (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e 500 mL (leite semidesnatado), o valor da proporção H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:leite = 0,4

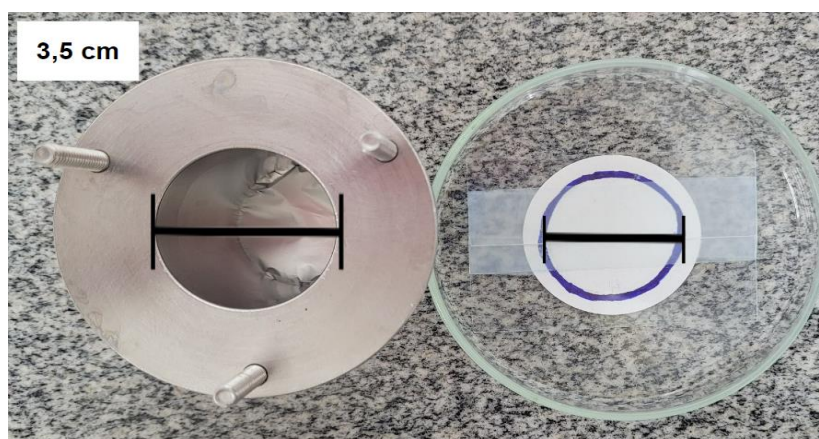
- Proporção de 0,4 (200 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:500 mL leite) para o teor de gordura 1% (leite semidesnatado)
- Proporção de 0,044 (22 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:500 mL leite) para o teor de gordura 0,11% (leite desnatado)
- Proporção de 1,2 (600 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:500 mL leite) teor de gordura 3% (leite integral)

## APÊNDICE C

### Critérios para a leitura dos filtros por microscopia óptica

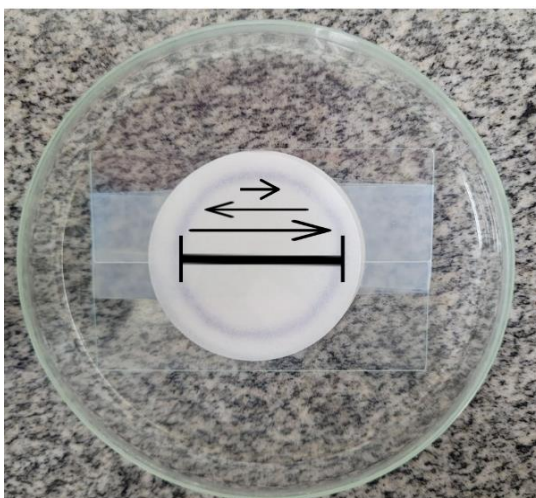
A leitura dos filtros analisados no estudo seguiu as recomendações indicadas no Guia para Identificação de Microplásticos, desenvolvido pela Marine & Environmental Research Institute (MERI). Dentre os critérios, está a delimitação do perímetro de filtração na membrana, conforme representado na Figura 1, de acordo com o diâmetro do copo metálico da unidade de filtração utilizada. Dessa forma, foi desenvolvido um molde de filtro com a delimitação da área a ser lida, utilizado abaixo dos filtros das amostras no momento da visualização por microscopia óptica (Figura 2). Movimentos lateralizados são recomendados para a leitura completa do filtro, conforme representado por flechas na Figura 2. Além disso, adotou-se como critério o contato de partículas suspeitas com uma agulha fina (Figura 3), para observação da integridade destas ao toque, auxiliando na exclusão de resíduos orgânicos.

**Figura 1** – Mensuração do diâmetro da unidade de filtração e delimitação da área a ser lida em um molde



Fonte: a própria autora (2023)

**Figura 2** – Filtro de amostra a ser lida sobre molde com perímetro delimitado. As flechas indicam o movimento realizado ao longo de todo o filtro para a leitura completa



Fonte: a própria autora (2023)

**Figura 3** – Agulha utilizada na etapa de leitura por microscopia óptica dos filtros das amostras de leite para verificação do comportamento das partículas ao contato



Fonte: a própria autora (2023)

## APÊNDICE D

### Protocolo para leitura dos filtros por microscopia de fluorescência

A etapa inicial para a leitura de partículas com o corante Vermelho do Nilo é o tratamento digestivo. Erni-Cassola e colaboradores (2017) utilizaram  $H_2O_2$  30% para esse fim, em um protocolo que inicialmente requer a aplicação de gotas do agente oxidativo e a exposição dos filtros a  $60^\circ C$  durante 1 hora. Passado esse período, as amostras devem permanecer durante 7h a  $100^\circ C$ , para então serem aplicadas gotas de água miliQ, e finalmente a aplicação do corante (2 a 3 gotas). Antes de levar ao microscópio, o filtro ainda permanece 10 minutos a  $60^\circ C$  no escuro. Os reagentes utilizados nesta etapa, bem como a estufa de aquecimento e o microscópio de fluorescência estão representados nas Figuras 1, 2 e 3.

**Figura 1** – Reagentes utilizados para a remoção da matéria orgânica nos filtros utilizados para o isolamento de MPs e o corante Vermelho do Nilo, mantidos em frascos conta-gotas de vidro apropriadamente estocados



Fonte: a própria autora (2023)

Da esquerda para a direita:  $H_2O_2$  30%, água miliQ e corante Vermelho do Nilo dissolvido em metanol ( $1 \mu g mL^{-1}$ ), todos filtrados previamente.

**Figura 2** – Estufa de secagem utilizada no protocolo de remoção de matéria orgânica dos filtros analisados no estudo



Fonte: a própria autora (2023)

**Figura 3** – Microscópio de fluorescência acoplado à câmera utilizado para a visualização dos filtros obtidos na análise e captura das partículas fluorescentes



Fonte: a própria autora (2023)

## APÊNDICE E

### Critérios e metodologia prévia à visualização de partículas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica aliada à análise de MPs por possibilitar a visualização em aumentos muito superiores daqueles obtidos em técnicas de microscopia óptica. Dessa forma, os detalhes da superfície são acessados, e é possível perceber o nível de desgaste dos MPs, bem como a estrutura que os compõe. Seis partículas foram selecionadas para a geração de imagens pela MEV, sendo três fragmentos e três fibras, previamente visualizados por microscopia óptica e microscopia de fluorescência, ou apenas por microscopia óptica e microscópio confocal acoplado ao espectroscópio Raman.

A região do filtro onde se localizavam tais partículas foram delimitadas por caneta fina, e recortados com auxílio de lâmina de bisturi em formato compatível para a deposição nos *stubs* (Figura 1), que por sua vez, continham a fita dupla face de carbono. As amostras assim posicionadas e fixadas eram encaminhadas ao equipamento *sputter coater* (revestidor por pulverização catódica) para o revestimento de plasma de ouro (Figura 2). A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura utiliza um feixe de elétrons para gerar imagens de alta resolução de amostras. Para que o feixe interaja adequadamente com a amostra, esta deve ser condutora, pois alguns elétrons do feixe são absorvidos pela amostra e precisam ser conduzidos para o fio terra. Caso a amostra não seja naturalmente condutora, pode-se transformá-la assim por meio de processos como evaporação ou deposição de íons, normalmente denominado *sputtering*. Além disso, o recobrimento das amostras com camadas depositadas pode melhorar a emissão de elétrons, facilitando a construção da imagem (GOLDSTEIN et al.,1992).

Após o revestimento de ouro, as amostras seguiam para o equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 3), em ambiente climatizado e com geração de imagens instantaneamente nos computadores conectados. Os *stubs* são posicionados como mostra a Figura 4, e então inicia-se o procedimento de emissão de elétrons para a geração das imagens, no caso, pelo método do elétron secundário.

**Figura 1** – *Stubs* com partículas aderidas à fita dupla face de carbono previamente ao revestimento de ouro



Fonte: a própria autora (2023)

**Figura 2** – Equipamento *sputter coater* (revestidor por pulverização catódica), onde é realizado o revestimento de ouro nas amostras a serem analisadas



Fonte: a própria autora (2023)

**Figura 3** – Microscópio Eletrônico de Varredura utilizado para a análise detalhada de fragmentos e fibras selecionados



Fonte: a própria autora (2023)

**Figura 4** – *Stubs* posicionados para a geração de imagens por MEV pelo método do elétron secundário



Fonte: a própria autora (2023)

## APÊNDICE F

### Comparação entre métodos de digestão do leite para a análise da eficiência na filtração

A rápida obstrução dos filtros comumente utilizados na etapa de isolamento de microplásticos é um desafio a ser enfrentado nos estudos envolvendo matrizes complexas, por conta da alta quantidade de matéria orgânica. No caso do leite, os alvos são as proteínas e gordura, que devem ser removidas ou consideravelmente reduzidas antes da filtração. Nesta matriz, os métodos oxidativo com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% e o multienzimático associado à digestão alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 25% foram relatados previamente à execução do presente teste (DIAZ-BASANTES et al., 2020; DA COSTA FILHO et al., 2021). Com vistas a este desafio comumente relatado (Prata et al., 2021), um teste comparativo entre métodos pré-filtração foi executado.

Amostras de leite pasteurizado foram submetidos a três diferentes tratamentos digestivos, sendo estes: digestão enzimática com a protease pepsina (identificado como método A); digestão com polisorbato, conhecido como Tween 20 (método B) e digestão oxidativa com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (método C). Além de avaliados individualmente, os métodos foram combinados e adotou-se uma alíquota de leite pasteurizado refrigerado como controle negativo. Foram considerados como parâmetros comparativos o tempo total para a realização dos métodos, a exigência de recursos e o volume filtrado no intervalo de 20 minutos. O método A requer ácido clorídrico (HCl) 1 N (para correção do pH da matriz para 3,5, necessário para a atividade da protease), pepsina liofilizada (10 mg/mL), pHmetro e banho-maria (37°C, 1h) (KITABATAKE & KINEKAWA, 1998). No método B, apenas o Tween 20 é o reagente adicionado à matriz (adição de 10% em relação ao volume da amostra) e necessita-se um banho-maria para aquecimento da mistura (60°C, 24h) (LOPES et al., 2022). Por fim, o método C requer diluição da matriz em água ultrapura (1:1) e adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (20% em relação ao volume da amostra). A solução foi mantida em temperatura ambiente por 72 horas (DIAZ-BASANTES et al., 2020). Após o tempo de reação requerido em cada método, as amostras foram filtradas em sistema a vácuo, utilizando um frasco de Buchner conectado à bomba de pressão regulada a 0,5 bar. Empregou-se filtro de celulose Whatman grade 1 (47 mm de diâmetro, porosidade de 11 µm).

Em relação ao tempo total do método, o primeiro (A) foi o de mais rápida execução (90 min), seguido pelo método B (24h30min) e C (72h20min). Quanto à necessidade de recursos, A é o mais exigente devido à acidificação da matriz, C requer a diluição do leite em água ultrapura e B não exige preparo prévio da matriz. O volume filtrado em 20 minutos foi o terceiro parâmetro comparativo, sendo A e B ineficientes, com a filtração de volume inferior a 50 mL cada um. O método C permitiu a filtração de 480 mL em um minuto, se mostrando válido para esse parâmetro. A combinação A+B gerou 196 mL filtrados, com tempo total de 27h20min para a técnica. Na combinação A+C, 528 mL foram filtrados em dois minutos, e o tempo de técnica foi de 72h30min. A combinação B+C foi inviável (volume filtrado inferior a 50 mL), com tempo de técnica de 72h40min. Por fim, a combinação A+B+C possibilitou a filtração de 570,8 mL, e a aplicação das três técnicas simultaneamente levou 72h45min. Quanto ao controle negativo, 100 mL foram filtrados após 20 min. O Quadro 2 reúne as informações citadas com os resultados obtidos nos métodos digestivos e suas respectivas combinações.

A acidificação da matriz no método A gerou a coagulação das proteínas, obstruindo o filtro. Futuros estudos poderão explorar outras proteases que não exijam acidificação, para enriquecer as conclusões acerca deste método aplicado ao leite. Autores que empregaram um detergente comercial multienzimático no leite (sem acidificação), obtiveram resultados satisfatórios (DA COSTA FILHO et al., 2021). O Tween 20 (método B) deve ser testado outras vezes no leite, já que, até o momento, nenhum estudo de MPs neste alimento reportou seu uso. No presente teste, buscou-se investigar a capacidade do Tween 20 em dispersar micelas de gordura, facilitando a filtração do leite, porém, sem êxito. É possível que diferentes concentrações do detergente e a combinação com outros reagentes possa ser eficiente para a digestão do leite. Considerando a aplicação prévia do método oxidativo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% no leite (DIAZ-BASANTES et al., 2020), resultados otimistas eram esperados para o método C. Contudo, ressaltamos a alta demanda para o tempo de execução, estabelecido em 72 horas. Propõe-se, portanto, futuros testes explorando variações na concentração do reagente e/ou sua combinação com diferentes métodos e tempos de reação, buscando acelerar o processo sem comprometer a eficiência. As combinações avaliadas neste estudo não demonstraram maior eficácia que o método C isoladamente. Notamos que os coágulos gerados no método A foram desfeitos com o

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, viabilizando a filtração com um ligeiro aumento no tempo em relação ao método C isolado.

**Quadro 2** – Resultados obtidos no teste de comparação entre três métodos de digestão aplicados ao leite e suas combinações

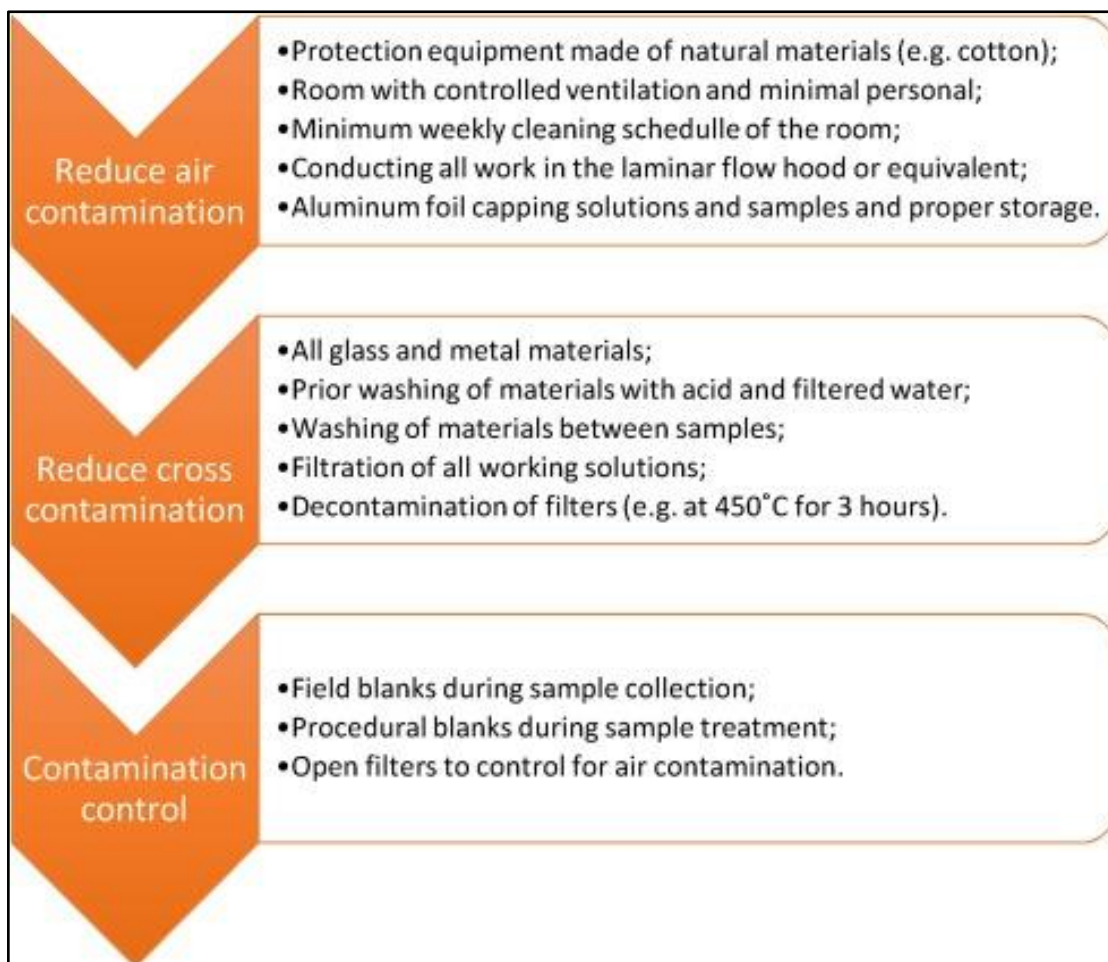
<b>Método</b>	<b>Tempo Total (h:min)</b>	<b>Recursos Necessários</b>	<b>Volume Filtrado em 20 min (mL)</b>
A (Pepsina)	1:30	HCl, pepsina, pHmetro, banho-maria	< 50
B (Tween 20)	24:30	Tween 20, banho-maria	< 50
C (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%)	72:20	Água Ultrapura, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	480
A + B	27:20	HCl, pepsina, Tween 20, banho-maria	196
A + C	72:30	HCl , pepsina, água ultrapura, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	528
B + C	72:40	Tween 20, água ultrapura, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	< 50
A + B + C	72:45	HCl, pepsina, Tween 20, água ultrapura, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	570,8
Controle Negativo	00:20	x	100

Fonte: a própria autora (2023)

**ANEXOS**

## ANEXO A

Procedimentos recomendados para redução de contaminação do ar, da contaminação cruzada e da contaminação durante a manipulação das amostras, realizados ao longo do presente estudo



Fonte: Prata et al. (2021)