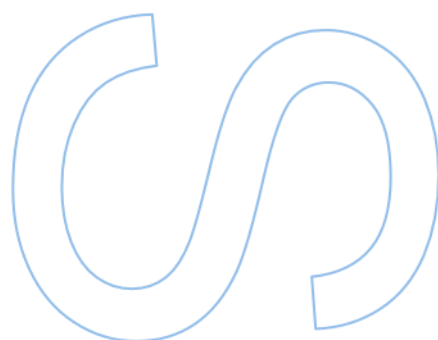


Identificação e quantificação de microplásticos na atmosfera do Porto e riscos para a saúde humana

Rui Santos

Mestrado em Ciências e Tecnologias do Ambiente
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento de Território
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2024



Identificação e quantificação de microplásticos na atmosfera do Porto e riscos para a saúde humana

Rui Santos

Mestrado em Ciências e Tecnologias do Ambiente
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento de Território
FCUP
2024

Orientador

Joaquim Esteves, Professor Catedrático, DGAOT FCUP

Coorientadora

Helena Ribeiro, Professora Auxiliar, DGAOT FCUP

Agradecimentos

Aos meus pais, irmão por todo o amor, carinho, dedicação que me deram durante toda a minha vida.

A todos os meus colegas de mestrado e não só, por toda a amizade, incentivo demonstrados durante o meu percurso académico.

À minha família, amigos, colegas e professores por todos os momentos de apoio, companheirismo e incentivo ao longo destes dois anos.

Ao meu orientador/supervisor Joaquim Esteves da Silva pelo seu apoio e conhecimentos transmitidos no decorrer não só da minha tese de mestrado, mas também durante o meu percurso académico.

À minha coorientadora Yuliya Logvina cujo apoio, disponibilidade, simpatia e paciência que demonstrou ajudaram profundamente na conclusão desta dissertação.

Resumo

Os microplásticos são pequenos fragmentos de plásticos que possuem medidas inferiores a 5 mm, podendo já possuir esse tamanho ou atingi-lo por meio de degradação. Estando presentes na atmosfera, os microplásticos podem absorver/adsorver alguns poluentes do ar, com por exemplo, os que saem de escapes de automóveis, assim como ligarem-se a compostos orgânicos, Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs) podendo ser considerados como cancerígenos. Sendo assim a população humana está exposta diariamente a microplásticos que contêm em si compostos prejudiciais à saúde humana, havendo estudos com evidências da presença de microplásticos na corrente sanguínea alojando-se em órgãos como os pulmões, cérebro e feto.

Neste trabalho científico pretende-se extrair os compostos de PAHs em amostras que estiveram expostas ao ar livre na FCUP. A preparação das amostras em estudo foi feita através de filtração adaptada para o tema de microplásticos com a separação de partículas por meio de crivos e filtros assim como o método de separação por densidade. As técnicas analíticas usadas neste projeto foram a microscopia ótica onde foram quantificados os microplásticos depois do processo de filtração, separação e deteção dos PAHs e por cromatografia gasosa acoplado com detetor de ionização de chama (GC-FID). A partir deste procedimento foi possível calcular taxas de recuperação a partir da leitura de cromatogramas para se definir a efetividade deste método.

Palavras-chave: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), cromatografia gasosa acoplado com detetor de ionização de chama (GC-FID), microscopia ótica.

Abstract

Microplastics are small fragments of plastic measuring less than 5 mm and may already be that size or reach it through degradation. Being present in the atmosphere, microplastics can absorb some polluting substances from the air, such as those that come out of car exhaust, as well as attaching themselves to organic compounds, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) that may be considered carcinogenic. Therefore, the human population is exposed daily to microplastics that contain compounds that are dangerous to human health, with studies showing evidence of the presence of microplastics in the bloodstream, lodging in organs such as the lungs, brain and fetus.

This scientific work aims to extract PAH compounds from samples that were exposed to the open air at FCUP. The preparation of the samples in this study was done through filtration adapted to the topic of microplastics with separation of particles using sieves and filters as well as the density separation method.

The analytical techniques used in this project were optical microscopy where microplastics were quantified after the filtration process, separation and detection of the PAHs and gas chromatography coupled with a flame ionization detector (GC-FID). From this procedure, it was possible to calculate recovery rates from reading chromatograms to define the effectiveness of this method.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID), optical microscopy.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de Gráficos	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	x
1. Introdução-Microplásticos	2
1.1. Saúde humana	2
1.2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - PAHs	3
2. Metodologia	6
2.1 Materiais	6
2.2 Técnicas analíticas	9
2.2.1 Microscopia ótica	9
2.2.2 GC-FID	10
3. Procedimento - Estudo de microplásticos/PAHs	11
3.1. Filtração	12
3.2 Separação por densidade	14
3.3 Controlo	14
3.4 Recuperação	14
3.5. Quantificação de microplásticos	15
3.5.1 Resultados de quantificação de microplásticos	16
3.6. Cromatografia gasosa	16
3.6.1 Extração de PAHs	16
3.6.2 Processo GC-FID	19
4. Resultados	20
4.1. Microscopia ótica	20

4.2. Extração dos PAHs.....	25
5. Conclusão.....	32
6. Referências Bibliográficas	33
1. Ragusa, A; Svelato, A.; Santacroce, C; Catalano, P.; Notarstefano, V.; Carnevali, O.; Para F.; Rongioletti Antonio, M.; Baiocco, F.; Draghi, S.; D'Amore, E.; Rinaldo, D.; Matta, M.; Giorgini, E. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta, 2021	33
Apêndice.....	1
Anexo	3

Lista de Tabelas

Tabela 1-16 PAHs de solução padrão	4
--	---

Lista de Gráficos

Gráfico 1 **Erro! Marcador não definido.**

Lista de Figuras

Figura 1-Amostrador do tipo passivo, innovation NILU AS Fonte: https://innovation.nilu.no/wp-content/uploads/sites/14/2020/04/innovation_nilu_Atmospheric_Microplastic_Collector_2020.pdf	6
Figura 2-Exemplo de crivo usado na filtração, Gravimeta Haver&Boecker	7
Figura 3-Exemplo de filtros usados de Whatman.....	7
Figura 4-Exemplo de filtros usados de FILTER-LAB.....	7
Figura 5-Solução 16 PAHs, Sigma-Aldrich Products.....	8
Figura 6-Sistema GC-FID, Chrozen.....	8
Figura 7-Microscópio usada em quantificação, Leica Microsystems	9
Figura 8-Amostradores afixados no jardim da FCUP para amostras por precipitação (esquerda) e amostras de microplásticos por deposição seca ou húmida (direita).....	11
Figura 9-Esquema de filtração de microplásticos original. Fonte https://www.preprints.org/manuscript/202304.1199/v1	13
Figura 10-Exemplo de contaminação observada num filtro pós filtragem.....	13
Figura 11-Fibra observada nos filtros.....	15
Figura 12-Microplástico observado nos filtros em microscópio Leica	16
Figura 13-Solução mistura de PAHs+hexano	17
Figura 14-Pedaços de filtro para preparação de analito.....	17
Figura 15-Garrafa de azoto de ar comprimido.....	18
Figura 16-Injetor onde a seringa entra com o analito	19
Figura 17-Percentagem de Fibras+MPs em amostra.....	20
Figura 18 – Percentagem de MPs por cada fração de 02-D-1-23 *Não entraram frações maiores.....	20
Figura 19- Percentagem de MPs por cada fração de 02-D-2-23 *Não entraram frações maiores.....	21
Figura 20 - Percentagem de MPs por cada fração de 03-D-1-23	21
Figura 21 - Percentagem de MPs por cada fração de 03-D-2-23	22
Figura 22 - Percentagem de MPs por cada fração de 04-D-2-23	22
Figura 23 - Percentagem de MPs por cada fração de 05-D-1-23	23
Figura 24 - Percentagem de MPs por cada fração de 05-D-2-23	23
Figura 25 - Percentagem de MPs por cada fração de 06-D-1-23	24
Figura 26 - Percentagem de MPs por cada fração de 06-D-2-23	24
Figura 27 - Percentagem de MPs por cada fração de 07-D-1-23	25

Figura 28 - Cromatograma de padrão/branco	25
Figura 29 - Cromatograma por injeção de hexano	26
Figura 30 - Cromatograma de Adição padrão densidade	26
Figura 31 - Cromatograma de Adição padrão	27
Figura 32 - PAH1 Adição padrão densidade	27
Figura 33 - PAH2 Adição padrão densidade	28
Figura 34 - PAH3 Adição padrão densidade	28
Figura 35 - PAH1 Adição padrão	29
Figura 36 - PAH2 Adição padrão	29
Figura 37 - PAH3 Adição padrão	30
Figura 38 - PAH4 Adição padrão	30
Figura 39 - PAH5 Adição padrão	31
Figura 40 - PAH6 Adição padrão	31

Lista de Abreviaturas

BPA	BISFENOL A
DEHP	DI(2-ETIL) FTALATO
DGES	DIREÇÃO GERAL DO ENSINO SUPERIOR
EPA	ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
FCT	FUNDAÇÃO PARA A CIÊNCIA E A TECNOLOGIA
FCUP	FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
GC-FID	GAS CHROMATOGRAPHY MASS SPECTOMETRY
GC-MS	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADO COM DETETOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA
MPS	MICROPLÁSTICOS
PAHS	HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS / POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS
UP	UNIVERSIDADE DO PORTO

1. Introdução-Microplásticos

Microplásticos (MPs) são fragmentos de plástico com tamanhos pequenos. Estes plásticos apresentam-se com uma medida inferior a 5 mm que estão em constante exposição a radiação ultravioleta, sendo que estes possuem este tamanho de forma natural ou por meios de degradação de pedaços maiores de plástico e podem ser usados em produtos cosméticos e pasta de dentes [1].

Os plásticos são gerados em grandes quantidades. Milhões de toneladas de plásticos são produzidas por ano e apenas 5% destes resíduos são reciclados, sendo que a maior parte fica dispersa no meio ambiente, fragmentando-se em plásticos mais pequenos e poluindo assim os solos, águas e ar, pondo em causa os ecossistemas, fauna, flora e saúde humana [2]. Durante os últimos anos foram pedidos a comissões internacionais para a redução/proibição de microplásticos que são adicionados a produtos como cosmética e detergentes assim como baixar a libertação de MPs em artigos têxteis.

Os microplásticos presentes na atmosfera têm como principais origens:

- Desgaste de pneus de veículos
- Degradação de objetos de plásticos com tamanhos maiores (ex: garrafas e sacos de plástico)
- Poluição industrial
- Lavagem de roupas sintéticas

1.1. Saúde humana

Como os microplásticos estão presentes em diferentes ambientes, assim como em organismos, os seus efeitos biológicos na vida animal, vegetal e humana têm sido extensivamente investigados nos últimos anos. Os microplásticos absorvem alguns poluentes do ar. Estas partículas podem também fundir como compostos orgânicos presentes na atmosfera, o que as tornam uma espécie de substrato para vírus e bactérias. O ser humano está exposto a estes poluentes através da ingestão de alimentos e bebidas, ambos específicos com material que contenha plástico ou através de contacto accidental (grelhados e bebidas empacotadas), assim como a inalação de partículas a partir de fumadores ativos e passivos e contacto dérmico. As partículas pequenas de plástico constituem um maior risco do que os plásticos de maiores dimensões, dado que podem infiltrar-se na corrente sanguínea, havendo assim a possibilidade de viajar pelo corpo, sendo que estas podem alojar-se em diversos órgãos do corpo humano como os pulmões, cérebro e até na placenta de mulheres grávidas

[1]. Existem compostos como Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), Bisfenol A (BPA), um químico que pode estar presente na urina e que pode interferir com o sistema hormonal e DEHP, ftalatos, um tipo de plástico com valores relativos nos corpos de crianças e adultos e que podem causar cancro e provocar alterações no sistema imunitário.

Dependo do tipo de trabalho que o humano emprega, podem resultar uma maior exposição e risco. Por exemplo, trabalhadores de minas estão em constante contacto com compostos orgânicos a partir de inalação e contacto dérmico aumenta o risco de doenças respiratórias [3].

Ainda que exista confirmação da contaminação a que o ser humano está exposto, os efeitos que os microplásticos podem causar à saúde humana são ainda muito limitados assim como o número de estudos e informação para estes efeitos sendo a sua ciência inconclusiva, uma vez que as consequências para a saúde humana têm origem nos compostos orgânicos presentes nos microplásticos que o ser humano ingere/inala.

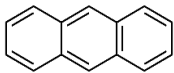
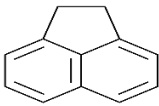
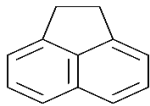
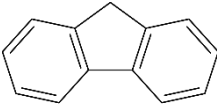
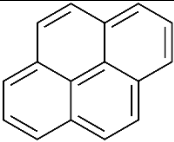
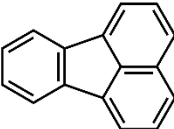
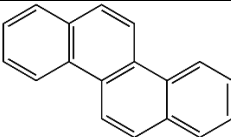
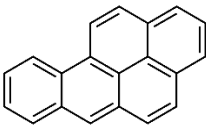
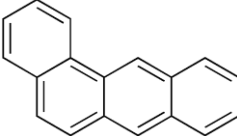
1.2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - PAHs

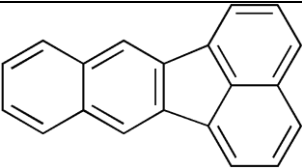
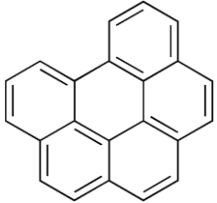
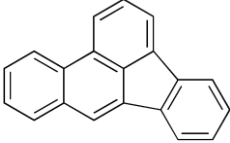
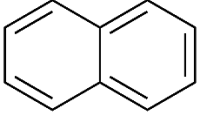
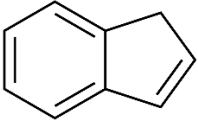
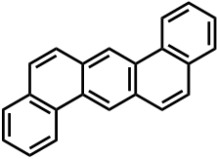
Um dos compostos que podem ser ligados aos microplásticos presentes na atmosfera são os PAHs. Estes são um grupo de compostos orgânicos que contêm carbono entre outros elementos formados por dois ou mais anéis aromáticos na sua estrutura química, podendo ser incolor, branco ou amarelos, existindo em mais de 10.000 formas de compostos. Os PAHs estão presentes na atmosfera, água, solo e sedimentos, e absorvidos por matéria particulada na atmosfera podendo, por ações de água e/ou vento, ser depositados e transportados [4].

Os PAHs são formados quando matéria orgânica com carbono é queimada, podendo ser criado tanto por fontes naturais como antropogénicas. Os PAHs geram-se a partir de incêndios florestais, atividade vulcânica, queima de resíduos e de combustíveis fósseis que criam uma fumaça para a atmosfera contendo estes compostos. Os PAHs presentes na atmosfera em que respiramos existe geralmente em níveis mais baixos comparando a oceanos e solos, mas fica dependente do tipo de ambiente. O ar urbano possui níveis mais elevados de PAHs em comparação com o ar de zonas rurais, sendo da proximidade de automóveis, cais pela queima de combustíveis fósseis e locais de construção.

Estes são os 16 PAHs listados pela EPA, considerados como risco para a saúde humana:

Tabela 1-16 PAHs considerados como risco para a saúde humana, de acordo com a EPA

PAH	Fórmula molecular	Estrutura molecular
Antraceno	$C_{14}H_{10}$	
Fenantreno	$C_{14}H_{10}$	
Acenafteno	$C_{12}H_{10}$	
Acenaftileno	$C_{12}H_8$	
Fluoreno	$C_{13}H_{10}$	
Pireno	$C_{16}H_{10}$	
Fluoranteno	$C_{16}H_{10}$	
Criseno	$C_{18}H_{12}$	
Benzo(a)pireno	$C_{20}H_{12}$	
Benzo(a)antraceno	$C_{18}H_{12}$	

Benzo(k)fluoranteno	$C_{20}H_{12}$	
Benzo(ghi)perileno	$C_{22}H_{12}$	
Benzo(b)fluoranteno	$C_{20}H_{12}$	
Naftaleno	$C_{10}H_8$	
Indeno	C_9H_8	
Dibenzo(a,h)antraceno	$C_{22}H_{14}$	

2. Metodologia

Para a quantificação de MPs e estudo de PAHs presentes em MPs, foi usado um conjunto de procedimentos:

- Captura de MPs em amostradores passivos;
- Separação em frações da matéria orgânica/inorgânica nas amostras por filtração;
- Quantificação de MPs presentes nos filtros em análise;
- Separação dos MPs em líquido denso;
- Extração dos PAHs das amostras;
- Análise de PAHs por GC-FID.

2.1 Materiais

Estes foram os materiais usados no decorrer deste estudo de microplásticos:

- Amostrador do tipo passivo, Coletor para os microplásticos atmosférico de matérias particulada seca e húmida. Norwegian Institute for Air Research (NILU), Figura 1;



Figura 1-Amostrador do tipo passivo, innovation NILU AS Fonte: https://innovation.nilu.no/wp-content/uploads/sites/14/2020/04/innovation_nilu_Atmospheric_Microplastic_Collector_2020.pdf

- Material laboratorial comum;
- Bomba vácuo para ar condicionado;
- Crivos para separação, Gravimeta Haver&Boecker com aberturas de malha de 125µm, 63µm e 25µm (modelo stainless steel frama AISI-304), Figura 2;



Figura 2-Exemplo de crivo usado na filtração, Gravimeta Haver&Boecker

- Filtros de papel/quartzo/vidro, Whatman-cytiva (Alemanha) e FILTER-LAB (Espanha), Figura 3 e 4;



Figura 3-Exemplo de filtros usados de Whatman



Figura 4-Exemplo de filtros usados de FILTER-LAB

- Solução stock de PAHs, Figura 5;

No decorrer deste estudo foi fornecido uma ampola com uma solução de 16 PAHs em ciclohexano de concentração 10 µg/L, que foi usada como solução padrão para a GC-FID. Este foi fornecido pela Sigma-Aldrich, Alemanha.



Figura 5-Solução 16 PAHs, Sigma-Aldrich Products

- Cromatografo gasoso acoplado com detetor de ionização de chama, Chrozen GC Figura 6;



Figura 6-Sistema GC-FID, Chrozen GC

- Microscópio ótico Leica Microsystems, Figura 7



Figura 7-Microscópio usada em quantificação, Leica Microsystems

- Centrífuga;
- Sonificador;
- Cloreto de sódio, Fluka, Alemanha;
- Acetonitrilo, Honeywell, Alemanha;
- Hexano, Sigma-Aldrich, França;
- Sacarose, Merk, Alemanha;

Todos os reagentes usados neste estudo foram de qualidade analítica.

2.2 Técnicas analíticas

2.2.1 Microscopia ótica

A microscopia ótica é um método o qual permite a ampliação de imagens através de um conjunto de lentes objetivas e oculares e uma luz que incide sobre a amostra que se pretende estudar. Para este estudo obtiveram-se filtros de papel/quartzo/vidro onde passaram pelo processo de filtração das amostras obtendo assim filtros com matéria que foi observado por microscopia ótica possibilitando a quantificação de microplásticos presentes nas amostras.

2.2.2 GC-FID

GC-FID é a combinação de duas técnicas, cromatografia gasosa, técnica de separação dos analitos e o detetor FID, formação de iões por chama e deteção. A cromatografia gasosa primeiro separa as diferentes componentes de uma mistura, sendo que depois, tais componentes ficam ainda mais separados dependendo da interação dos analitos com o polímero da coluna. O detetor FID normalmente utiliza uma chama de hidrogénio e ar para a qual a amostra é transferida para oxidar moléculas orgânicas e produzir iões eletricamente carregados, sendo que estes são recolhidos e produzem um sinal elétrico que é depois medido. A partir dos cromatogramas de GC-FID, sendo estes tridimensionais, são fornecidos espetros de massa que podem ser usados para identificação de analitos não reconhecidos e para determinar propriedades químicas e estruturais de moléculas, assim como o cromatograma é usado para análise de informação qualitativa e quantitativa.

3. Procedimento - Estudo de microplásticos/PAHs

Foi feito um estudo de quantificação de MPs e de PAHs presentes em MPs a partir da captação de microplásticos no próprio campus da FCUP, Figura 8. Os amostradores para captação de amostras estão instalados em Campo Legre no jardim da FCUP, da zona do Porto, sendo que existe um captador para partículas captadas por precipitação, e outro para matéria particulada a partir de deposição seca e húmida, ambos fornecidos pela empresa NILU. Ambos os amostradores são do tipo passivo usado para recolha de amostras de microplásticos de 2 em 2 semanas, ficando dependente da estação do ano e/ou atividade climática, sendo que, havendo uma maior atividade de chuva existe uma maior recolha no volume de amostras. Após a recolha das amostras nos respetivos recipientes, estas são lavadas por água desionizada, procede-se à respetiva filtração destas amostras. As amostras captadas e processadas para a execução desta tese decorreram entre Fevereiro e Julho de 2023, sendo que, para este estudo, foram apenas analisadas as amostras do amostrador de microplásticos por deposição seca ou húmida, Figura 8.



Figura 8-Amostradores afixados no jardim da FCUP para amostras por precipitação (esquerda) e amostras de microplásticos por deposição seca ou húmida (direita)

3.1. Filtração

Tendo recolhido as amostras em captadas pelos amostradores, procedeu-se à filtração dos microplásticos e matéria captados nos amostradores. Este procedimento de recolha foram adaptados para o tipo de situação, estudo e amostras a partir de um estudo de micro/nano-plásticos, [Figura 9]. A filtração das amostras foi efetuada através da passagem da água do coletor com material contido, por crivos (125 μm , 63 μm e 25 μm) para separação de tamanhos maiores e por filtros de papel/quartzo/vidro para separação de tamanhos menores com o auxílio de bomba de vácuo para um matraz de kitazato. A passagem da amostra pelo primeiro crivo de 125 μm , serve na maior parte para a separação de partículas que não têm interesse para este estudo, assim como o crivo de 63 μm , cerca de metade do crivo anterior, para a diferenciação de tamanho das partículas da amostra. Outro material que pode estar presente na captação das amostras é o pólen, que na sua maioria possui um tamanho de cerca de 50 μm . Para fazer a separação entre o pólen atmosférico e microplásticos utilizou-se o último crivo de 25 μm . Para além disso, como existe a possibilidade de microplásticos de frações menores ficarem colados a partículas maiores, os crivos depois do processo de filtração foram introduzidos em gobelés com uma solução de peróxido de hidrogénio 15% (H_2O_2), que ficou em repouso durante 7 dias a temperatura ambiente e tendo respetivamente passado pelo processo de sonificação no início e no fim por 30 segundos com auxílio de um processador ultrassónico, procedendo-se depois a uma repetição de filtração das amostras nos góbeles pelos mesmos crivos lavados e filtradas para um filtro de 12 μm para cada crivo.

Depois da filtração por meio de crivos, tendo amostras abaixo de 25 μm , seguiu-se a filtração por meio de filtros de papel/quartzo/vidro. Os filtros utilizados têm um tamanho de porosidade de 12 μm nitrato de celulose, 1,2 μm acetato de celulose, 0,7 μm e 0,22 μm fornecidos pela Whatman-cytiva e FILTER-LAB.

Sendo assim os filtros ficaram divididos pelas seguintes frações:

- >125 μm
 - 125-63 μm
 - 63-25 μm
 - 25-12 μm
 - 12-1,2 μm
 - 1,2-0,7 μm
 - 0,7-0,22 μm
- Frações de crivos filtradas para filtros de 12 μm depois de 7 dias com H_2O_2 15%.
- Frações somadas entre os dois métodos de separação de amostra

Os processos de captação das amostras e respetiva filtração foram efetuados no mesmo dia no decorrer do período mencionado. Estes filtros foram depois respetivamente pesados para identificar a contaminação presente e guardados num congelador até o início da quantificação de microplásticos por microscopia.

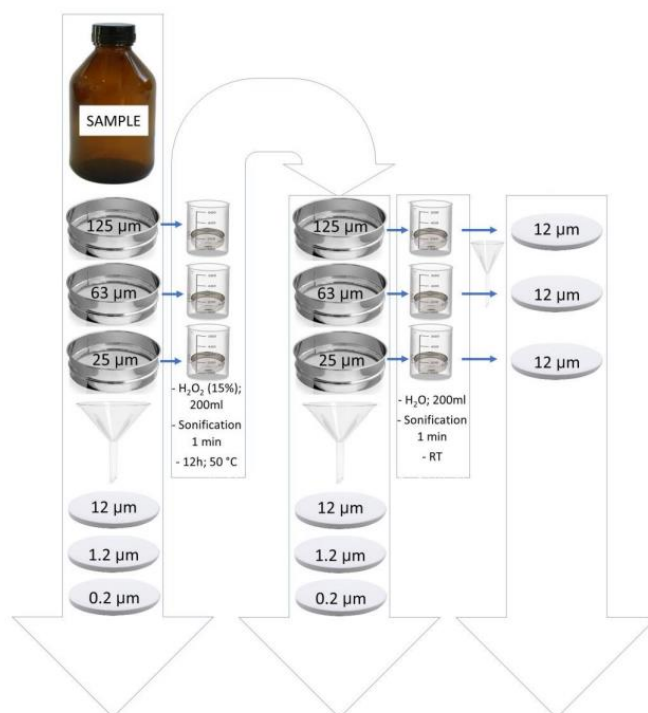


Figura 9-Esquema de filtração de microplásticos original. Fonte <https://www.preprints.org/manuscript/202304.1199/v1>



Figura 10-Exemplo de contaminação observada num filtro pós filtração

3.2 Separação por densidade

Existe um outro método que foi testado para a separação da amostra para as frações menores e respetiva quantificação da contaminação. A separação por densidade é um método de divisão de misturas homogéneas/heterogéneas entre sólidos e/ou líquidos em que o material mais denso é separado do material mais denso na diferença entre as suas densidades e pelo facto dos dois líquidos ou líquido-sólido serem insolúveis entre si. As amostras usadas em análise na sequência da primeira filtração, o volume da amostra a partir da separação pelo filtro de 12 μm foram separadas em volumes iguais, em que uma metade foi usada para a restante filtração por filtros de porosidade menor e a outra metade foi usada para o método de densidade.

As amostras abaixo de 12 μm foram colocadas num cone de Imhoff de 1L tendo sido adicionado uma mistura de sacarose e NaCl, com uma proporção de 50g de sacarose e 32g de NaCl por cada 100ml da amostra, tendo ficado em repouso 20 min. Depois foi retirado parte da mistura que ficou no fundo do recipiente até ficar o volume que apresentou 3 cm da amostra no cone de Imhoff, procedendo-se depois à filtração por filtros de 1,2 μm e 0,7 μm para a finalidade de quantificação microscópica.

3.3 Controlo

Para quantificar mais precisamente a contaminação das amostras foram feitos ensaios de filtração de branco como controlo de qualidade. As amostras de controlo servem para monitorização de qualquer contaminação que o laboratório pode emitir, para assim identificar quaisquer desvios em comparação com os resultados que provieram dos procedimentos de filtração das amostras. Dependendo das condições do ensaio, equipamento e manuseamento das amostras, estas podem revelar certas quantidades de contaminação.

Para este estudo foram feitos 3 controlos para os crivos para filtração de crivos e filtros descritos no procedimento e 3 controlos dos cones de Imhoff para separação por densidade, tendo sido apenas usada água desionizada.

3.4 Recuperação

Tendo sido escolhido este método de estudo de microplásticos existe a possibilidade de existirem interferências entre analitos analisados e o material usado no processo de captação e preparação da amostra, assim como a relação entre o analito e o método analítico selecionado. Sendo assim, foram realizados 2 testes de recuperação usando um polímero de polietileno, previamente suspenso em água desionizada 200ml filtrada pelo crivo 125 μm , identificado no microscópio e colocado no coletor da amostra e feito

o mesmo procedimento de filtração visto depois quantos microplásticos passaram utilizando várias amostras para determinar a variação de concentração do analito. Mais 3 testes de recuperação foram feitos para determinar a taxa de recuperação de PAHs no processo de extração dos MPs.

3.5. Quantificação de microplásticos

Para cada filtro de cada fração das amostras foi quantificado o número de microplásticos, identificando pelas cores vivas diferentes (azul, vermelho, verde, rosa, amarelo, laranja) observadas assim como a presença de fibras, Apêndice.

Para a quantificação dos microplásticos das frações maiores foi usado um microscópio ótico, Figura 7, enquanto que para as frações 12-1,2 μ m e 1,2-0,7 μ m, foi usado um microscópio ótico com digitalização de imagens em tempo real, Figura 11. Para se determinar o tamanho das amostras filtradas utilizou-se o próprio software da marca Leica, LAS EZ, Leica Application Suite Version 3.4.0.



Figura 11-Fibra observada nos filtros

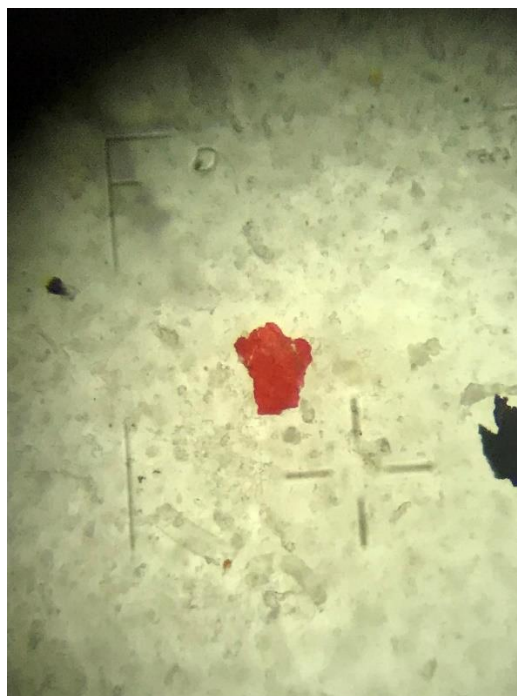


Figura 12-Microplástico observado nos filtros em microscópio Leica

3.5.1 Resultados de quantificação de microplásticos

Foram quantificados o número de microplásticos e fibras presentes nas amostras filtradas assim como os ensaios de controlo, tendo-se no final subtraído a quantidade observada no controlo para se obter uma quantificação mais precisa. Cada amostra foi numerada com o número do mês, número e tipo de amostra e ano. Exemplo 02-D1-23, primeira amostra de fevereiro 2023.

Dados disponíveis na Tabela 2, Anexo.

3.6. Cromatografia gasosa

3.6.1 Extração de PAHs

Para análise por GC-FID foi utilizado a solução padrão de PAHs. A partir desta solução foram dissolvidos 1,9 μL em 20 mL de Hexano obtendo-se uma concentração de 0,95 $\mu\text{g/L}$ stock-padrão.

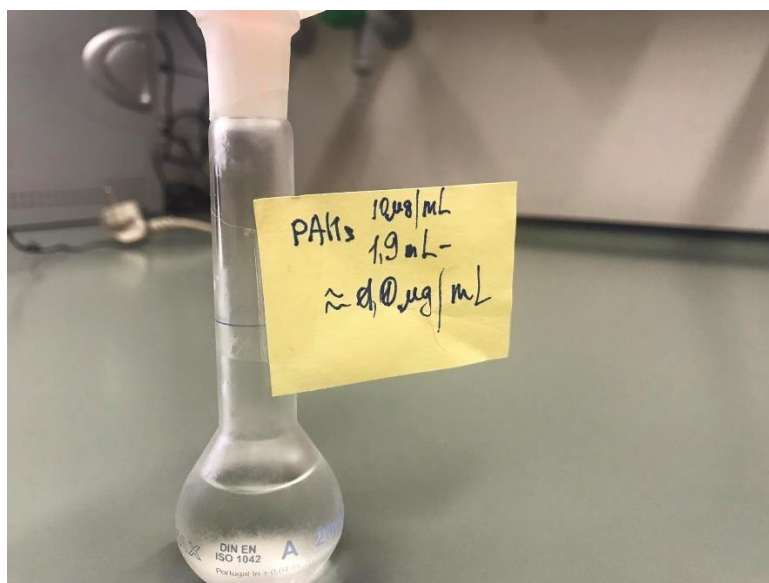


Figura 13-Solução mistura de PAHs+hexano

Foram também preparados filtros das amostras anteriormente separadas e cortados em 5 partes iguais.

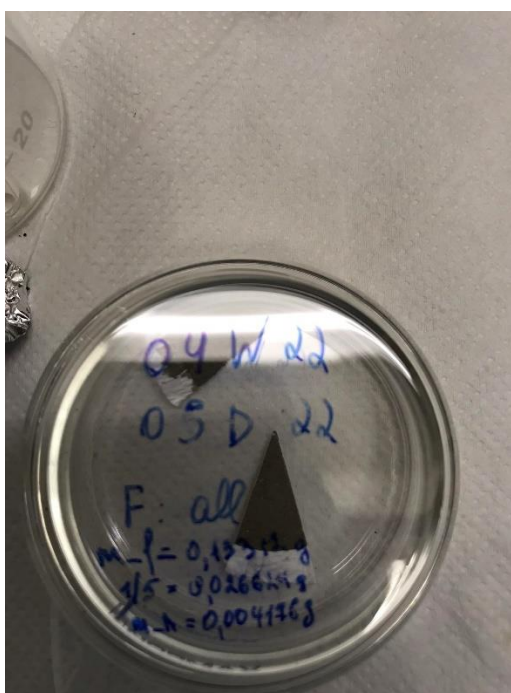


Figura 14-Pedaços de filtro para preparação de analito

Foram colocados e misturados 5 mL de acetonitrilo e um pedaço de filtro cortado da amostra para um tubo de ensaio. Esta mistura foi submetida a sonificação ultrassónica por 30 min seguido da sua colocação na centrífuga a 2500 rpm por 5 min. Este processo de adição de acetonitrilo, sonificação e centrifuga foi repetido 3 vezes para

cada 1/5 dos pedaços de filtro. No final das repetições a mistura foi filtrada através de um injetor para um balão que foi ligado a uma pistola de gás azoto de ar comprimido, Figura 15.



Figura 15-Garrafa de azoto de ar comprimido.

Após a total secagem da mistura, foram preparados 5 frascos com quantidades de PAHs stock/padrão, hexano e amostra para servir da injeção a GC-FID.

Tabela 2-Proporções de hexano, PAH padrão e hexano para formar o analito

Volumes μL	1	2	3	4	5
Conc. PAHs	0	0,4	0,5	0,6	0,7
Vol. PAH	0	40	50	60	70
Vol. Amostra	30	30	30	30	30
Vol. Hexano	70	30	20	10	0
Vol. Final	100	100	100	100	100

3.6.2 Processo GC-FID

A primeira parte de uma análise a partir de GC-MS é a cromatografia gasosa. As suas principais componentes são: a fase móvel, em que as componentes a entrar em isolamento passam por um solvente líquido ou gasoso; a peneira molecular, um material com poros de tamanho uniforme preparados artificialmente, sendo que, na cromatografia gasosa, o mais comum é o aluminossilicato de cálcio; a coluna e fase estacionária para além de um detetor.

O processo de leitura de GC-FID é feito através do software YL-Clarity Chromatography Station, onde é introduzido um método de leitura de PAHs e acontece da seguinte forma:

1. Ligadas ao sistema GC, estão garrafas de ar comprimido a alta pressão de H₂, Hidrogénio, He, Hélio e uma mistura de ar/gases comprimidos que acelera a combustão;
2. A amostra é introduzida no GC antes da coluna através de uma seringa com um volume de amostra de 0,2 µL;
3. As moléculas separam-se tendo em conta a forma como interagem com a fase estacionária, havendo também separação de analitos apolares por colunas apolares e analitos polares por colunas polares.
4. Após os diferentes componentes passarem pelo detetor, estes saem da coluna, estão ficam exibidos num cromatograma, um gráfico que apresentam resultados em formas de picos da relação entre o sinal elétrico pela altura de cada pico e o tempo de retenção do composto analisado por cromatografia.



Figura 16-Injetor onde a seringa entra com o analito

4. Resultados

4.1. Microscopia ótica

Dos resultados obtidos pela quantificação de microplásticos pela microscopia ótica e analisando as quantidades de fibras e microplásticos em percentagem em amostras, percebe-se que as quantidades de fibras constituem percentagens menores comparadas com a percentagem de microplásticos, Figura 17

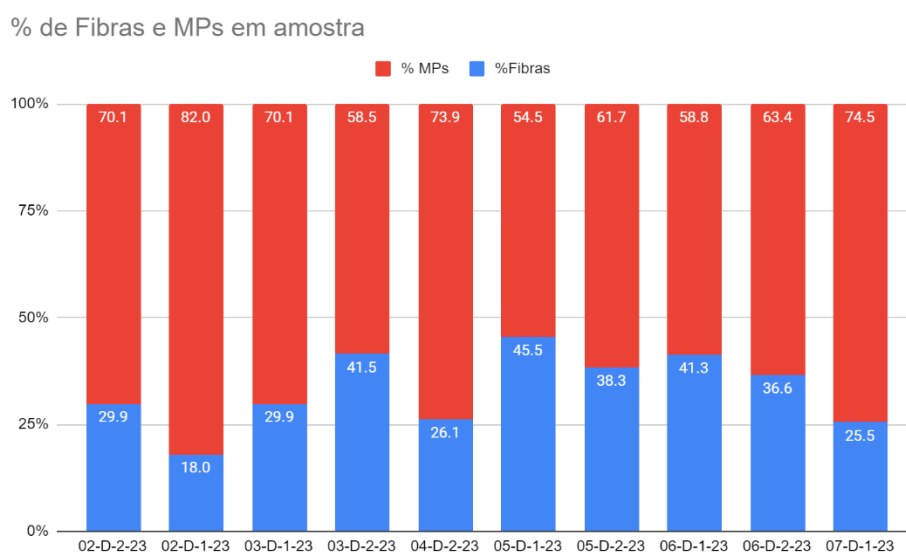


Figura 17-Percentagem de Fibras+MPs em amostra

Na percentagem da quantidade de microplásticos entre as frações analisadas, observa-se:

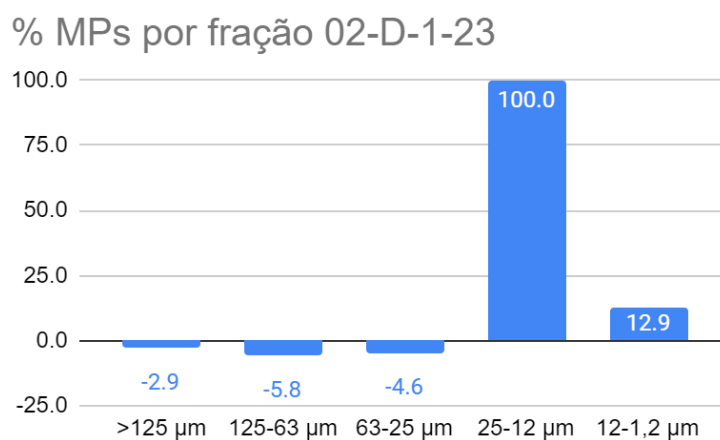


Figura 18 – Percentagem de MPs por cada fração de 02-D-1-23 *Não entraram frações maiores

% MPs por fração 02-D-2-23

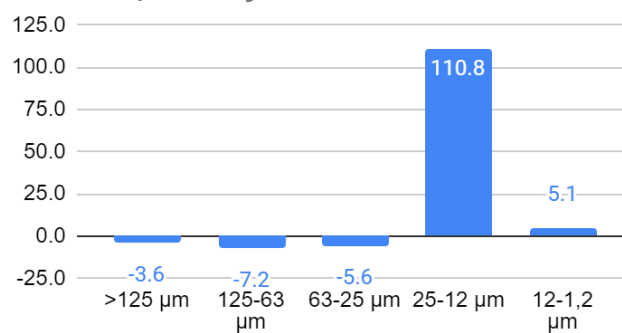


Figura 19- Percentagem de MPs por cada fração de 02-D-2-23 *Não entraram frações maiores

Para amostras captadas em fevereiro, não foram incluídas as frações maiores, logo existe uma maior percentagem de frações mais pequenas.

% MPs por fração 03-D-1-23

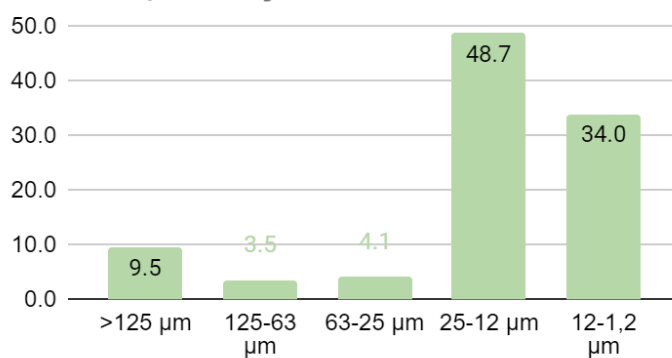


Figura 20 - Percentagem de MPs por cada fração de 03-D-1-23

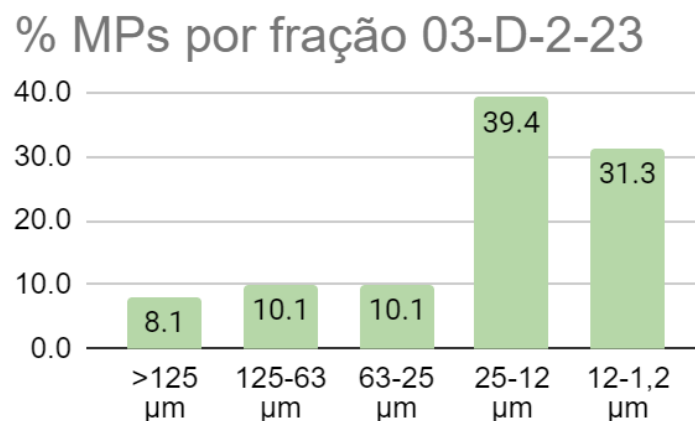


Figura 21 - Percentagem de MPs por cada fração de 03-D-2-23

Nas amostras captadas em março observa-se uma maior percentagem em frações de microplásticos de dimensões menores. De acordo com os dados meteorológicos (Anexo 1), março foi o mês com maior precipitação durante este estudo.

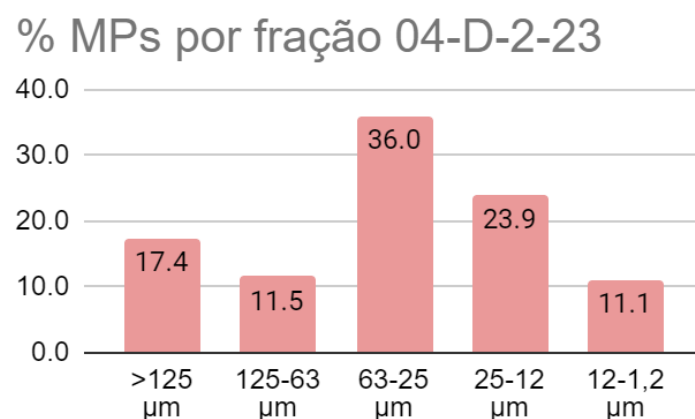


Figura 22 – Percentagem de MPs por cada fração de 04-D-2-23

Durante o mês de abril a fração 63-25 µm obteve um maior número de microplásticos comparativamente com a outros, possivelmente concentrações pequenas de pólen na atmosfera que existem com maior frequência durante os meses de primavera.

% MPs por fração 05-D-1-23

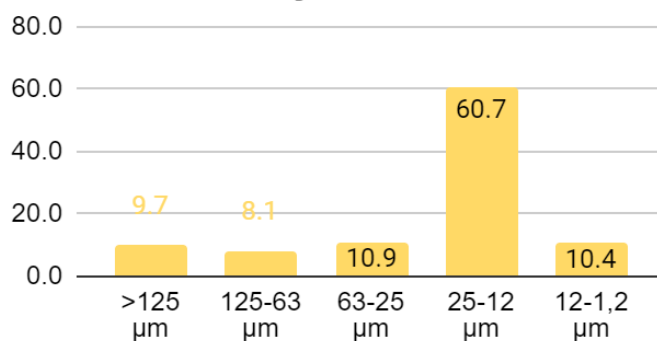


Figura 23 - Percentagem de MPs por cada fração de 05-D-1-23

% MPs por fração 05-D-2-23

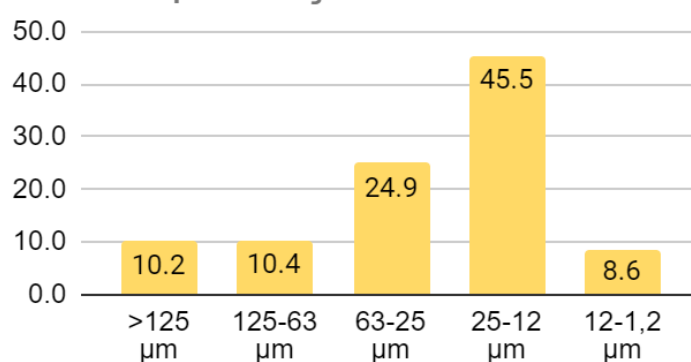


Figura 24 - Percentagem de MPs por cada fração de 05-D-2-23

Existe uma maior percentagem de microplásticos na fração 25-12 µm para o mês de maio em ambas as quinzenas. Este mês teve pouca precipitação, mas houve altas velocidades de vento, ajudando ao transporte de partículas.

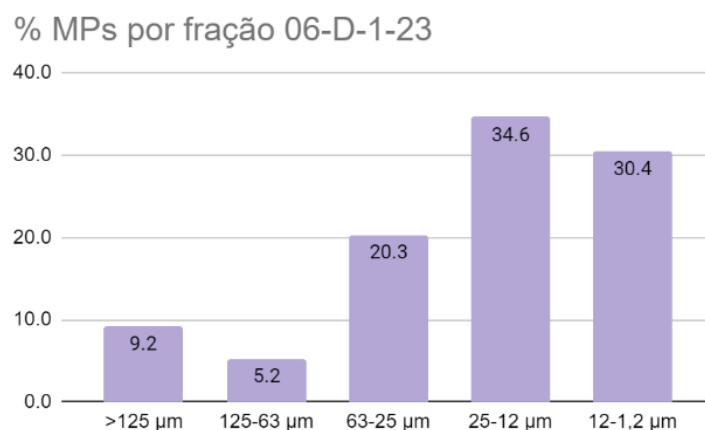


Figura 25 - Percentagem de MPs por cada fração de 06-D-1-23

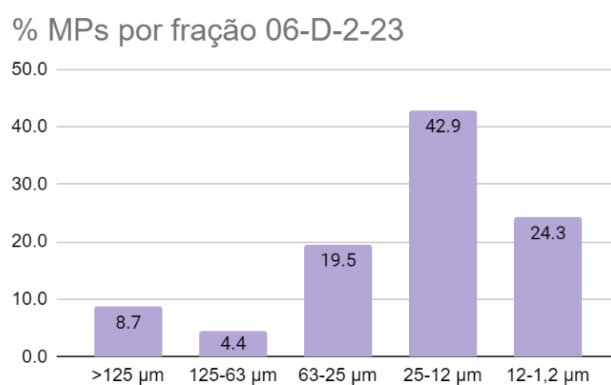


Figura 26 - Percentagem de MPs por cada fração de 06-D-2-23

Para o mês de junho também houve poucas partículas observadas para as frações maiores, sendo que foi um mês com precipitação moderada e alta humidade relativa média.

% MPs por fração 07-D-1-23

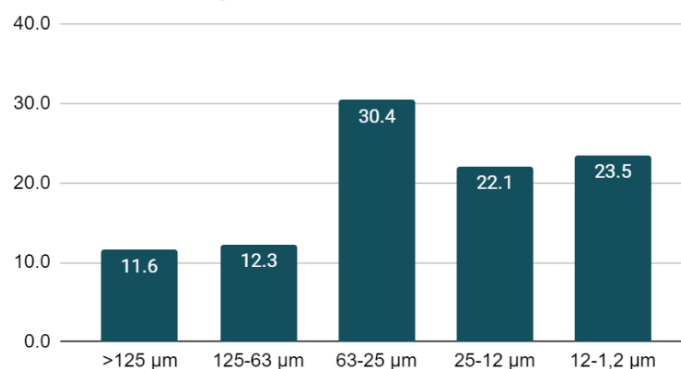


Figura 27 - Percentagem de MPs por cada fração de 07-D-1-23

As partículas de microplásticos observadas no mês de julho esteve bastante proporcionada pelas frações existentes, sendo que comparadamente com as percentagens observadas em junho, observou-se menos precipitação.

4.2. Extração dos PAHs

Depois da injeção do analito no GC obtiveram-se os seguintes cromatogramas que relacionam a voltagem (mV) e o tempo de retenção (28 min. máximo).

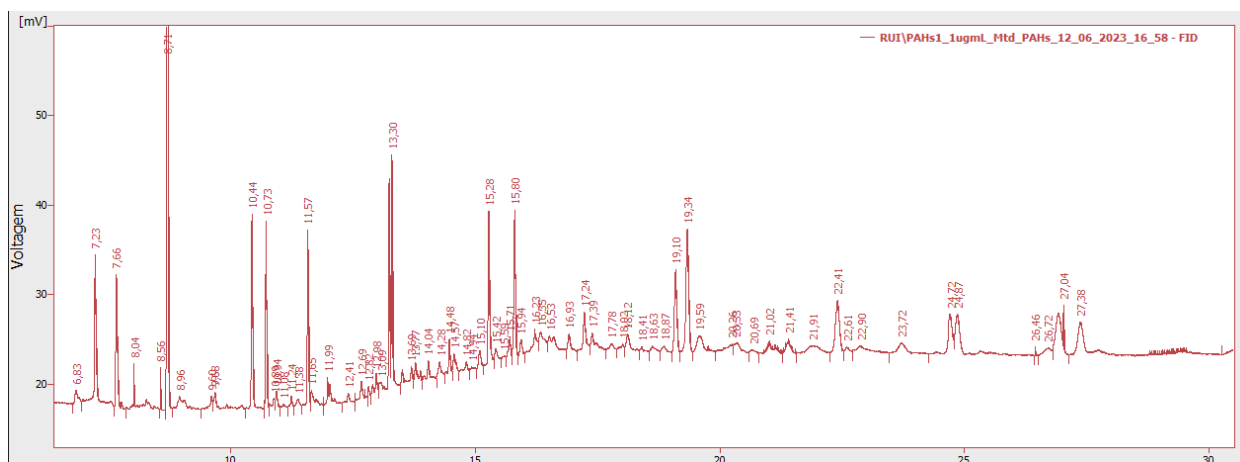


Figura 28 - Cromatograma de padrão/branco

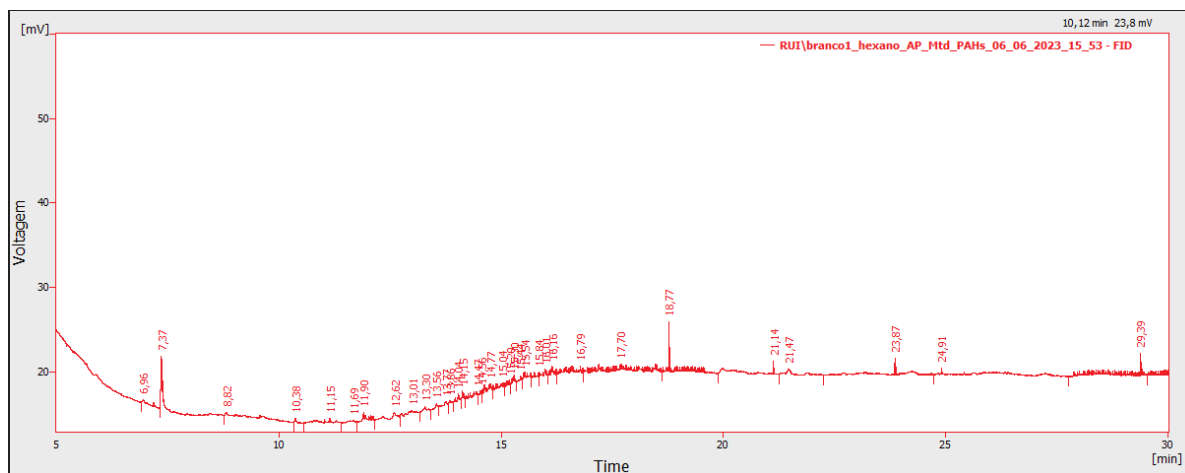


Figura 29 - Cromatograma por injeção de hexano

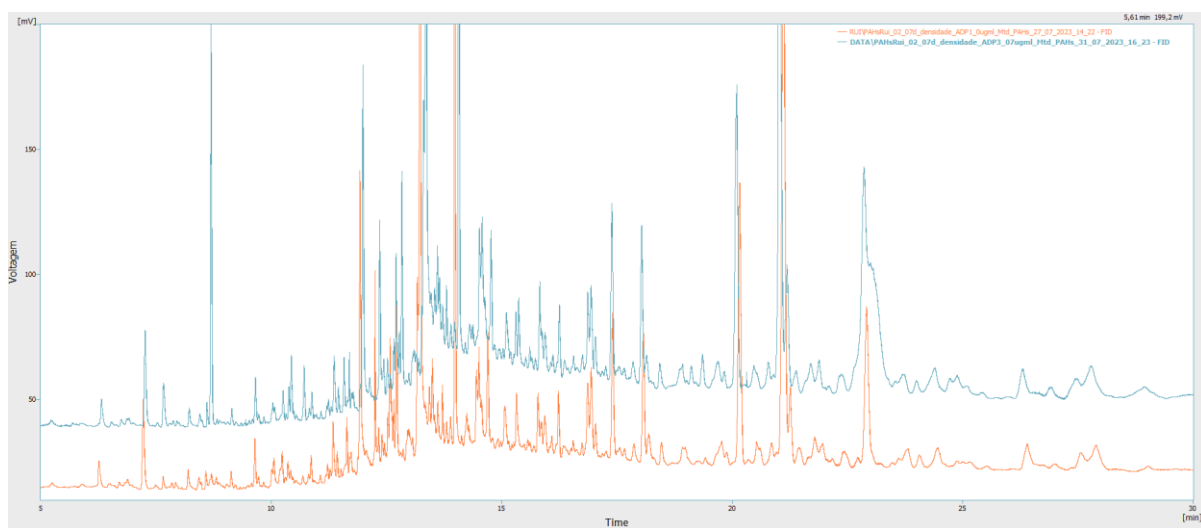


Figura 30 - Cromatograma de Adição padrão densidade

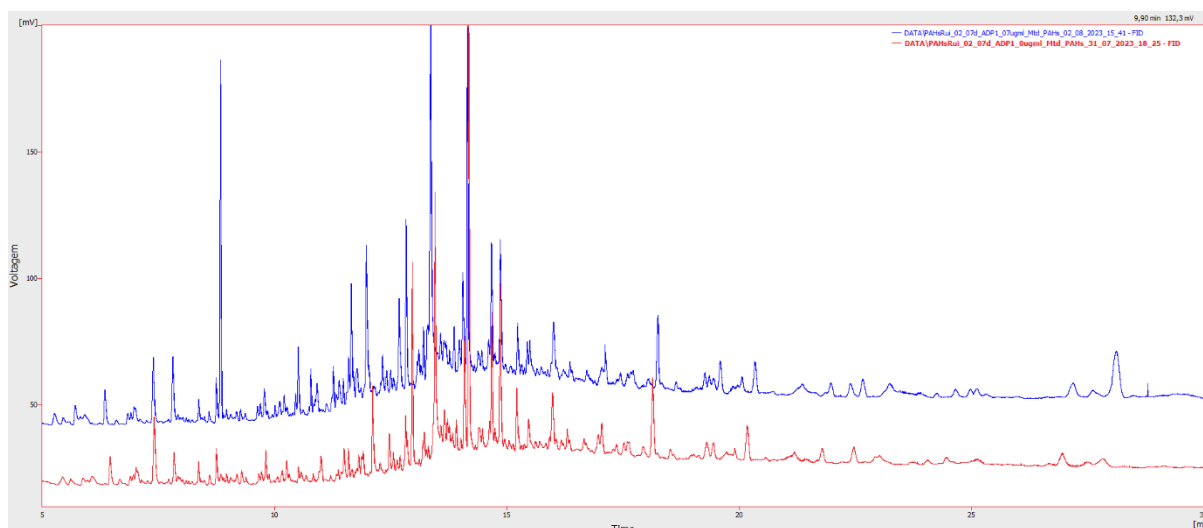


Figura 31 - Cromatograma de Adição padrão

Através dos cromatogramas de adição padrão observa-se alguns crescimentos nos picos em que cada um simboliza um PAH, sendo que estes picos aconteceram com tempos de retenção médios de 8,71/10,47/13,1/13,38/15,28 e 19,34.

Para cada pico foi calculada a sua área sendo que foi obtida uma média das áreas obtidas para cada uma das repetições de injeções de analito.

Para a densidade foram observados 3 picos enquanto que para a outra adição padrão observaram-se 6 picos. Com estas áreas foram calculadas as retas de calibração.

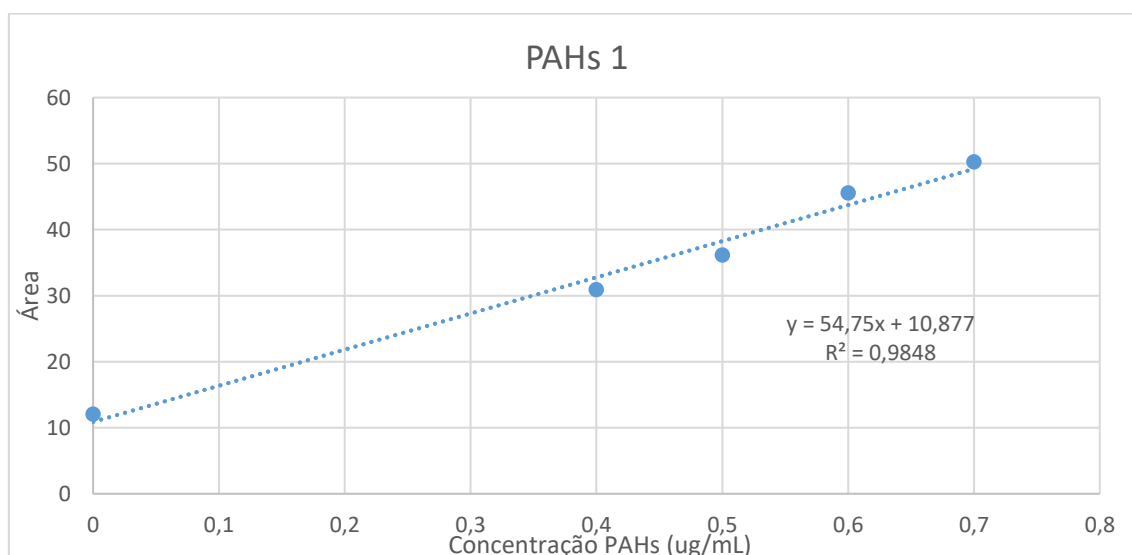


Figura 32 - PAH1 Adição padrão densidade

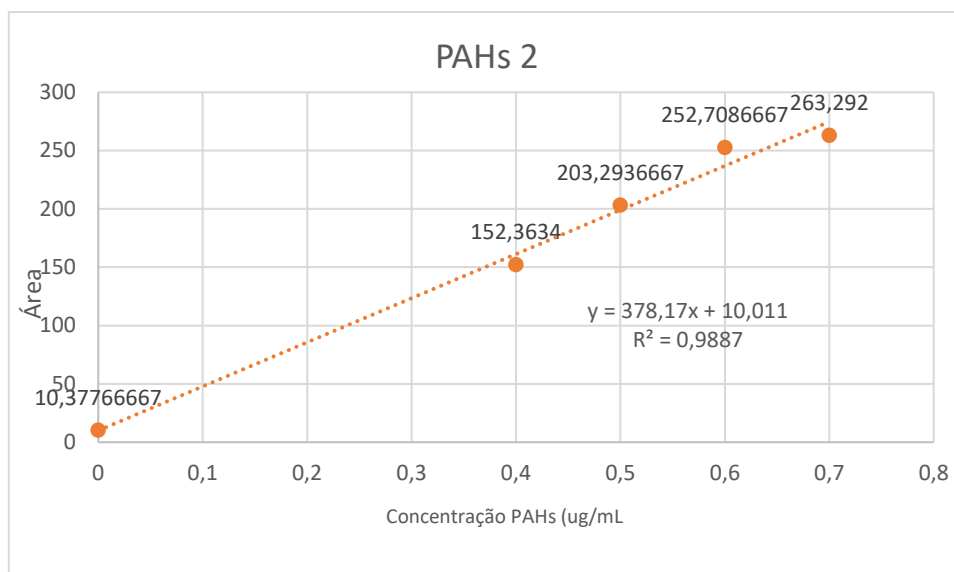


Figura 33 - PAH2 Adição padrão densidade

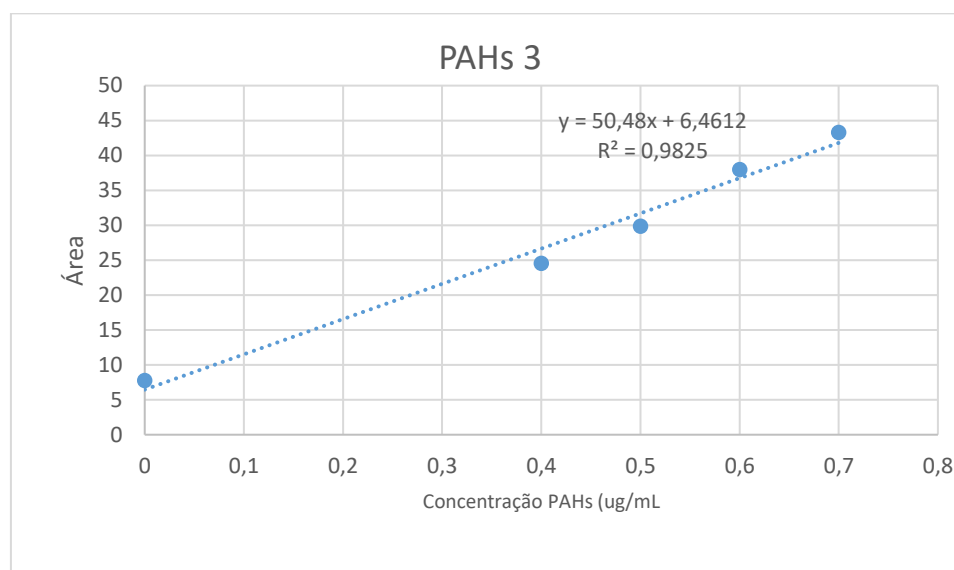


Figura 34 - PAH3 Adição padrão densidade

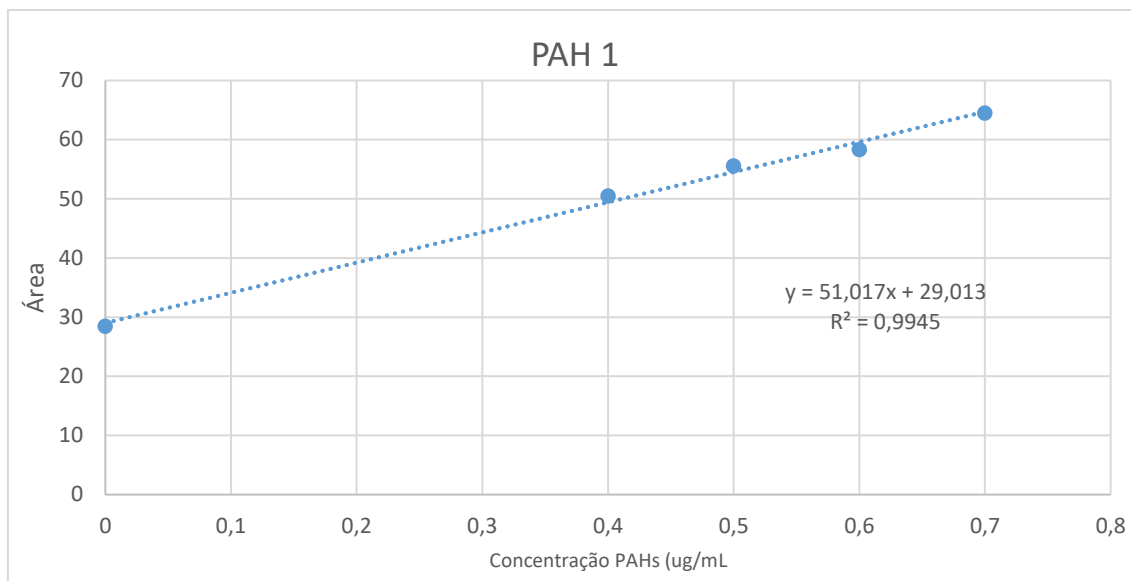


Figura 35 - PAH1 Adição padrão

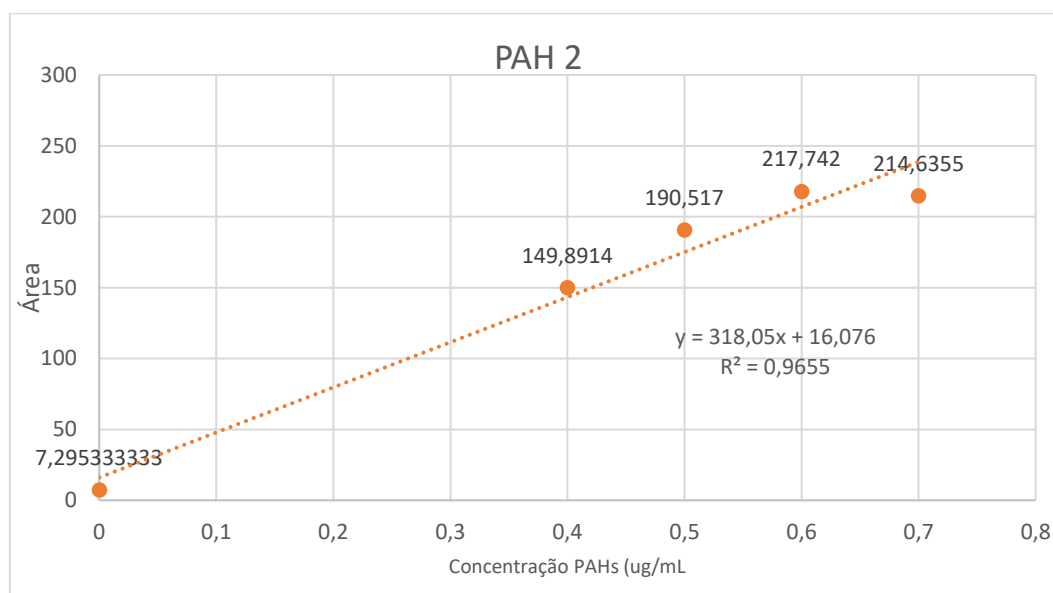


Figura 36 - PAH2 Adição padrão

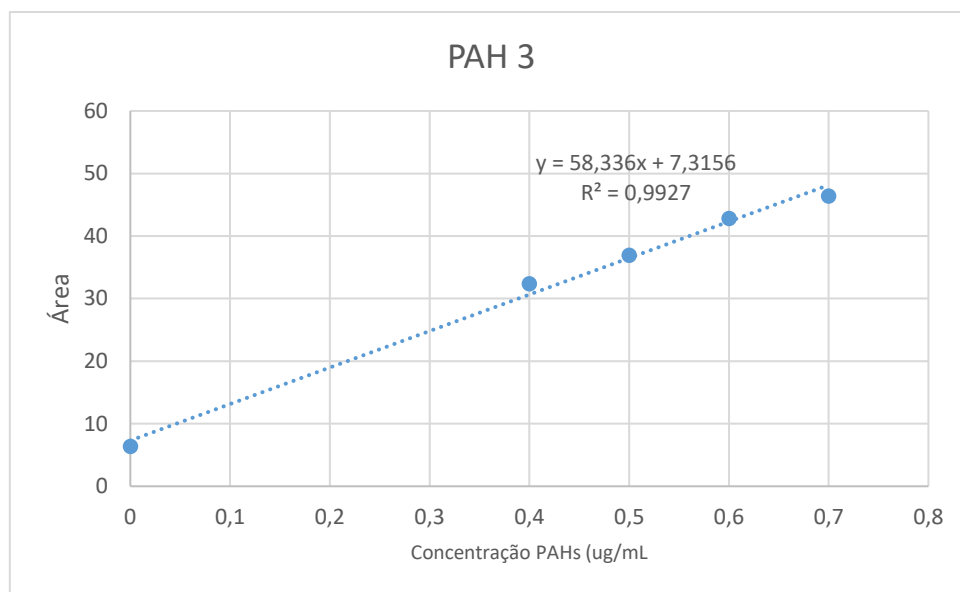


Figura 37 - PAH3 Adição padrão

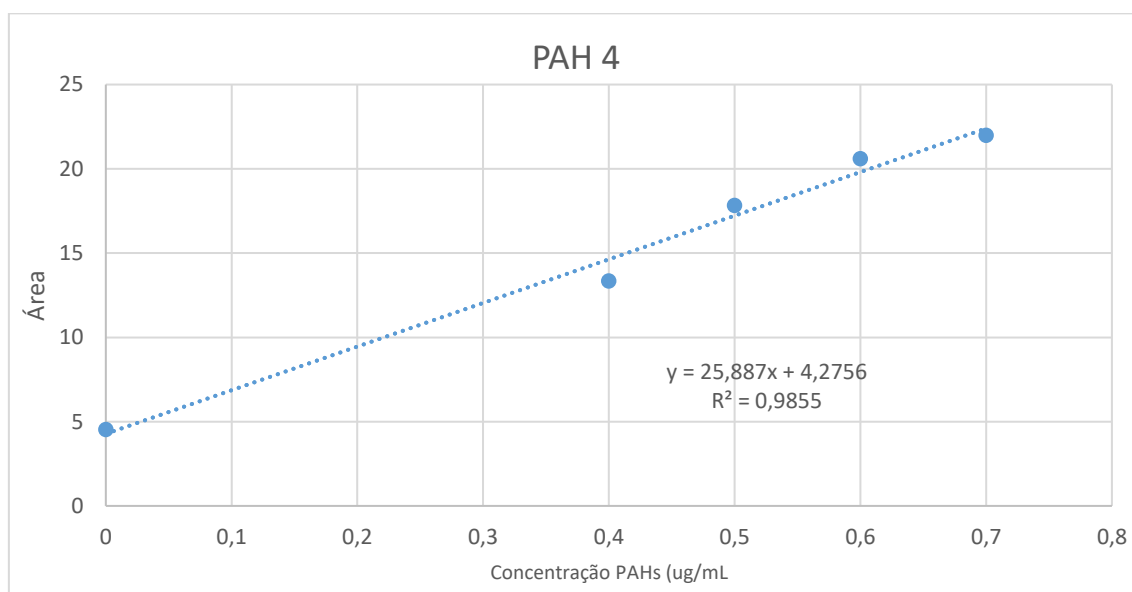


Figura 38 - PAH4 Adição padrão

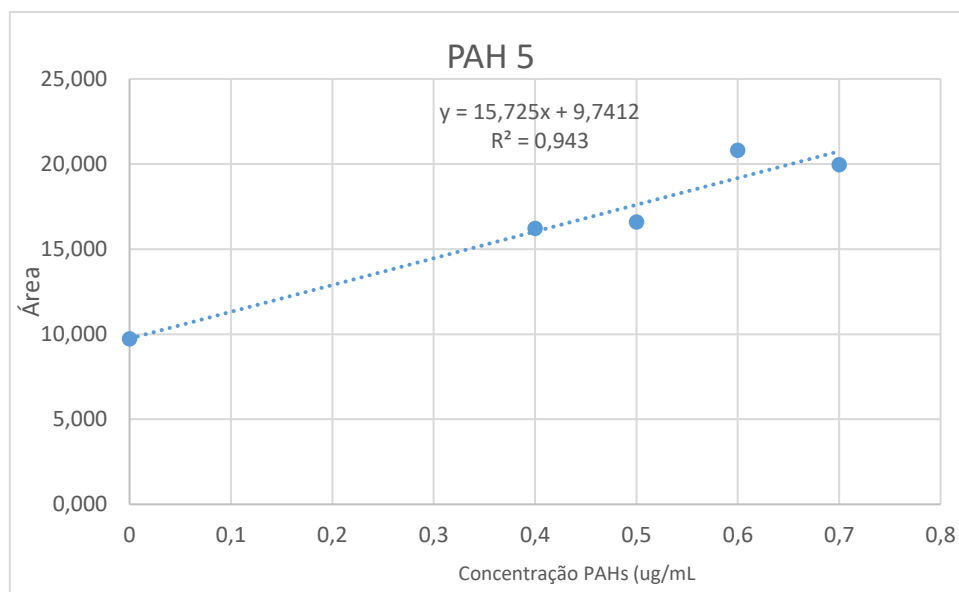


Figura 39 - PAH5 Adição padrão

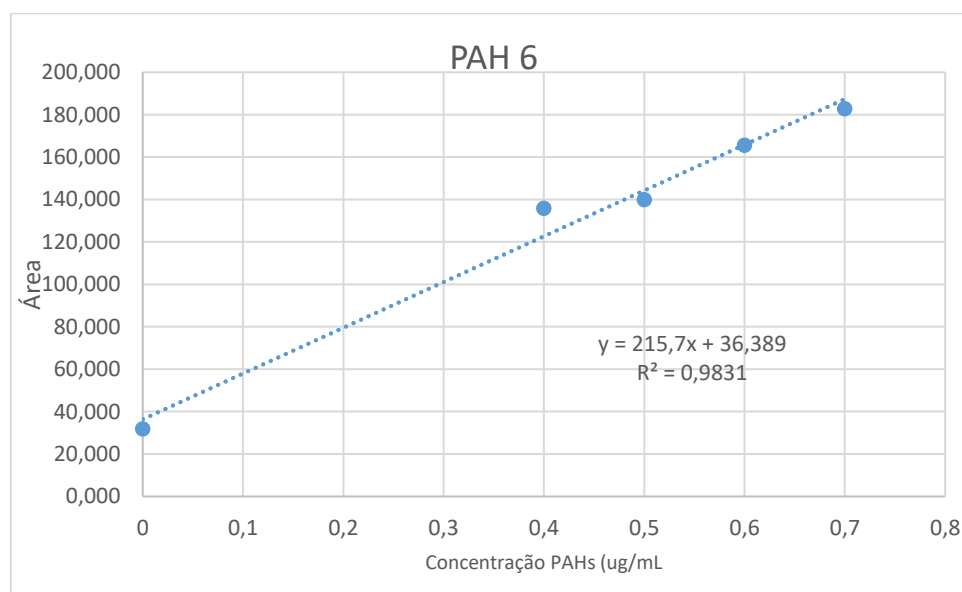


Figura 40 - PAH6 Adição padrão

Com estas retas de calibração das médias das áreas dos picos, conseguimos chegar ao resultado da seguinte fórmula:

$$\% = (\text{Amostra} + \text{APD} + \text{Extração}) / (\text{Amostra} + \text{Extração} + \text{ADP}) * 100$$

Este cálculo permite calcular a taxa de recuperação deste método de análise.

Para adição padrão obtiveram-se taxas de 9,87%, 5,4%, 12,3% respetivamente para cada pico.

Para densidade obtiveram-se taxas, para além das já mencionadas, de 27,3%, 96,8% e 5,8% respetivamente.

5. Conclusão

Neste trabalho foi realizada uma otimização de técnicas analíticas existentes sendo que foram adaptadas para a realização da tese com o tema de estudo de microplásticos atmosféricos e a presença de PAHs.

Ao longo do período do estudo, a filtração das amostragens foi feita quase exclusivamente através da separação por crivos e filtros de papel/quartzo/vidro para tamanhos menores, sendo foi decidido também fazer a divisão pelo método de densidade, por questões de tempo e comparação dos dois métodos para quantificação.

Na quantificação de PAHs por microscopia observou-se um alto número quer de fibras, quer de microplásticos, que foram determinados pela altura em que o estudo foi efetuado assim como condições climáticas que aumentaram o número de amostras captadas. No estudo de comparação dos dois métodos de separação, observou-se um maior número de microplásticos em separação por densidade, quando comparados os dados para a fração menor de 12-1,2 μm (excluindo os números observados nos controlos), sendo que para as outras frações no método de separação por crivos e filtros houve uma variação para os dados observados ao longo do período em estudo de acordo com fatores como velocidade do vento, precipitação e humidade relativa.

A partir da cromatografia gasosa foi possível observarem-se cromatogramas para o estudo de relação entre as áreas dos picos dos PAHs que saíram do detetor do sistema GC-FID ao cálculo de taxas de recuperação a partir das retas de calibração das concentrações dos PAHs em que a maioria foram baixas, sendo que estas dependeram do procedimento assim como o tipo de PAH que se observou nos cromatogramas. Para um estudo de formação da tese os resultados, mesmo sendo percentagens de taxa de recuperação baixas e variáveis entre si, são considerados como aceitáveis para um método que foi adaptado para um tema onde não existe tanta informação em termos de efeitos para a saúde humana, doses toleráveis para ingestão/inalação o que mostra que acerca do tópico de análise de PAHs ainda existe muitos mais estudos e métodos por criar.

6. Referências Bibliográficas

1. Ragusa, A; Svelato, A.; Santacroce, C; Catalano, P.; Notarstefano, V.; Carnevali, O.; Para F.; Rongioletti Antonio, M.; Baiocco, F.; Draghi, S.; D'Amore, E.; Rinaldo, D.; Matta, M.; Giorgini, E. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta, 2021
2. Guo, J.; Huang, X; Xiang, L; Wang, Y.; Li, Y; Li, H, Cai, Q.; Mo, C.; Wong, M. Source, migration and toxicology of microplastics in soil, 2020
3. Smith, M.; Love, D.; Rochman, C.; Neff, R. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health, 2018
4. Ghosal, D.; Ghosh, S.; Dutta, T.; Ahn, Y. Current state of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review, 2016

Apêndice

Tabela 3 - Quantificação de fibras/microplásticos

Amostras	Fração	Fibras	Microplásticos					Laranja
			Vermelho	Azul	Verde	Amarelo	Rosa	
Controlo 1	>125 µm	8	0	1	0	1	0	1
	125-63 µm	8	2	2	1	0	0	2
	63-25 µm	10	0	0	0	2	0	1
	25-12 µm	19	3	1	0	2	0	2
	12-1,2 µm	1	5	1	0	0	0	2
Controlo 1 (densidade)	12-1,2 µm (densidade)	2	1	1	0	2	0	4
Controlo 2	>125 µm	9	0	0	1	0	0	1
	125-63 µm	7	1	1	0	1	0	1
	63-25 µm	8	2	1	0	1	0	2
	25-12 µm	7	9	5	0	1	0	3
	12-1,2 µm	6	4	0	0	0	0	2
Controlo 2 (densidade)	12-1,2 µm	0	0	2	0	3	0	2
Controlo 3	>125 µm	11	0	1	0	0	0	1
	125-63 µm	17	0	0	0	1	0	2
	63-25 µm	7	1	1	0	0	0	0
	25-12 µm	3	2	2	0	1	0	2
	12-1,2 µm	17	6	2	0	0	0	1
Controlo 3 (densidade)	12-1,2 µm (densidade)	2	0	0	0	2	0	3
07-D-1-23	>125 µm	14	6	6	0	4	0	11
	125-63 µm	20	12	3	0	5	0	8
	63-25 µm	6	29	2	1	8	0	29
	25-12 µm	7	18	9	1	9	1	13
	12-1,2 µm	0	1	19	0	14	0	20
07-D-1-23 (densidade)	12-1,2 µm (densidade)	52	12	8	0	48	0	34
06-D-2-23	>125 µm	27	2	5	0	4	0	6
	125-63 µm	8	5	0	0	2	0	2
	63-25 µm	16	11	6	1	7	0	11
	25-12 µm	16	27	9	7	16	1	22
	12-1,2 µm	14	7	11	2	6	2	18
06-D-2-23 (densidade)	12-1,2 µm (densidade)	56	8	36	4	36	0	20
06-D-1-23	>125 µm	11	0	3	0	5	0	5
	125-63 µm	24	0	4	0	2	0	2
	63-25 µm	29	11	4	0	7	0	9
	25-12 µm	6	21	1	7	11	0	15
	12-1,2 µm	16	7	15	0	10	0	16
06-D-1-23 (densidade)	12-1,2 µm (densidade)	40	8	12	4	32	0	24

05-D-2-23	>125 μm	32	11	2	1	8	0	10
	125-63 μm	25	15	1	1	4	0	12
	63-25 μm	27	31	5	1	20	0	24
	25-12 μm	82	54	22	8	28	0	38
	12-1,2 μm	10	0	3	2	16	0	10
05-D-2-23 (densidade)	12-1,2 μm (densidade)	38	14	14	0	16	0	8
05-D-1-23	>125 μm	50	2	10	0	10	0	16
	125-63 μm	38	8	3	0	4	0	13
	63-25 μm	87	10	4	0	11	0	16
	25-12 μm	118	90	31	8	26	1	79
	12-1,2 μm	8	0	19	2	8	0	12
05-D-1-23 (densidade)	12-1,2 μm (densidade)	36	16	14	0	18	2	12
04-D-2-23	>125 μm	65	20	10	1	41	0	42
	125-63 μm	12	11	3	1	27	0	33
	63-25 μm	48	58	43	2	62	0	69
	25-12 μm	48	31	17	3	49	1	55
	12-1,2 μm	22	1	29	0	18	2	22
04-D-2-23 (densidade)	12-1,2 μm (densidade)	12	12	14	4	10	0	18
03-D-2-23	>125 μm	0	0	3	1	0	0	0
	125-63 μm	0	0	0	0	3	0	2
	63-25 μm	9	0	1	0	0	0	3
	25-12 μm	1	4	1	1	1	0	6
	12-1,2 μm	0	0	3	0	6	0	2
03-D-2-23 (densidade)	12-1,2 μm (densidade)	22	16	18	2	26	2	16
03-D-1-23	>125 μm	0	3	1	0	6	1	4
	125-63 μm	3	1	0	0	1	0	3
	63-25 μm	0	0	4	0	0	0	1
	25-12 μm	23	17	7	1	22	0	28
	12-1,2 μm	8	5	23	0	14	0	10
03-D-1-23 (densidade)	12-1,2 μm (densidade)	44	4	24	4	10	0	30
02-D-1-23	>125 μm							
	125-63 μm							
	63-25 μm							
	25-12 μm	11	21	7	2	18	0	32
	12-1,2 μm	0	3	2	0	4	0	1
02-D-1-23 (densidade)	12-1,2 μm (densidade)	7	6	12	1	7	0	7
02-D-2-23	>125 μm							
	125-63 μm							
	63-25 μm							
	25-12 μm	26	18	6	3	18	0	27
	12-1,2 μm	0	0	1	0	2	0	3
02-D-2-23 (densidade)	12-1,2 μm (densidade)	2	1	2	1	5	0	6

Anexo

Tabela 4- Dados atmosféricos observados durante o estudo

Amostra	Precipitação total (mm)	Temperatura media (°C)	Humidade relativa média (%)	Velocidade do vento máxima média (m/s)
02-D-1-23	0,199	12,4566567	55,945234	7,575868667
02-D-2-23	5,771	12,437222	67,10668667	5,554031133
03-D1-23	52,933976	12,473279	81,4144467	7,303831
03-D-2-23	37,809992	14,154089	79,03598267	6,8087866
04-D-1-23	7,412748	16,191584	71,762904	7,2689108
04-D-2-23	43,199573	15,963231	74,88632667	6,9722702
05-D-1-23	9,153997	18,0659753	80,1232967	6,249064267
05-D-2-23	0,597	18,639791	57,56425333	9,033584667
06-D-1-23	13,117415	18,7933113	80,5859373	6,084609733
06-D-2-23	43,564395	19,93909	84,18335929	7,737228214