



MANUAL TÉCNICO

PARA ANÁLISES DE MICROPLÁSTICOS EM ANIMAIS

Cândida Juliana Albertin-Santos
Laureen Michelle Houllou
Arthur Felipe Ferreira de Freitas
Geraldo Jorge Barbosa de Moura

Cândida Juliana Albertin-Santos
Laureen Michelle Houllou
Arthur Felipe Ferreira de Freitas
Geraldo Jorge Barbosa de Moura

MANUAL TÉCNICO

PARA ANÁLISES DE MICROPLÁSTICOS EM ANIMAIS

Recife, 2026

DIRETOR DO CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE-CETENE
MARCELO BRITO CARNEIRO LEÃO

COORDENADOR DE GESTÃO ADMINISTRATIVA-COGEA
FREDERICO TOSCANO BARRETO NOGUEIRA

COORDENADOR DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO- COTEC
JAMES CORREIA DE MELO

S446a Manual Técnico para Análises de Microplásticos em Animais.
Cetene, 1ª ed. Recife: 2026.

37p.: il.

Organizadores: Cândida Juliana Albertin-Santos;
Laureen Michelle Houllou; Arthur Felipe
Ferreira de Freitas; Geraldo Jorge Barbosa
de Moura.

Inclui referências.

ISBN: 978-65-02-28772-9

1. Microplásticos 2. Vertebrados 3. Invertebrados
4. Técnicas 5. Poluição I. Autor II. Título

CDD B869.1

DIREITOS DESTA EDIÇÃO RESERVADOS AO: CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS
DO NORDESTE-CETENE. AV. PROF. LUÍS FREIRE, Nº 1, CIDADE UNIVERSITÁRIA, RECIFE-
PE, CEP 50740-545. TELEFONE: (81) 3334-7200.

www.gov.br/cetene/pt-br

Copyright ©CETENE by 2026.

É permitida a reprodução parcial desta obra desde que citada à fonte bibliográfica (Albertin-Santos, C. J.;
Houllou, L. M.; Freitas, A. F. F.; Moura, G. J. B. Manual Técnico para Análises de Microplásticos em Animais.
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-Cetene. Recife. 1ª ed., 37p., 2026. doi:
[10.5281/zenodo.21873188](https://doi.org/10.5281/zenodo.21873188)).

DISTRIBUIÇÃO GRATUITA - VENDA PROIBIDA.

REALIZAÇÃO



CETENE
CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE

MINISTÉRIO DA
**CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO**



APOIO



UFRPE



LEHP

Laboratório de Estudos Herpetológicos e Paleoherpetológicos

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste manual foi um trabalho construído por muitas mãos. Cada etapa, das atividades de campo aos procedimentos realizados em laboratório, contou com a colaboração de pessoas que compartilharam conhecimentos, experiências, tempo e dedicação.

Agradecemos, de maneira especial, aos membros das comunidades pesqueiras que contribuíram com sua experiência e seu conhecimento sobre os ambientes e os organismos estudados. A convivência e o diálogo durante as atividades de campo foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Nosso agradecimento também aos bolsistas institucionais, estudantes, técnicos e pesquisadores que participaram das coletas, do processamento das amostras, das análises laboratoriais, dos registros e da organização das informações. O envolvimento de cada um foi essencial para que os procedimentos aqui apresentados pudessem ser desenvolvidos, padronizados e sistematizados.

Agradecemos às equipes e às coordenações de pesquisa, desenvolvimento tecnológico e gestão administrativa do CETENE, cujo apoio tornou possível conciliar as demandas científicas, técnicas e operacionais envolvidas na elaboração desta publicação. À Direção do CETENE, registramos nosso reconhecimento pelo suporte institucional e pelo incentivo à produção e à disseminação do conhecimento científico.

Estendemos nossos agradecimentos ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e à titular da pasta, pelo suporte institucional destinado ao desenvolvimento da ciência e à atuação das unidades de pesquisa. O apoio público à ciência é fundamental para a continuidade das pesquisas, a formação de profissionais e a transformação do conhecimento em benefícios para a sociedade.

Por fim, agradecemos às instituições parceiras e a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Ainda que nem todos possam ser mencionados individualmente, cada contribuição tornou possível a construção deste manual.

Os Organizadores.

PREFÁCIO

A poluição por microplásticos figura hoje entre os temas mais urgentes da agenda ambiental global. Partículas plásticas com dimensões inferiores a cinco milímetros já foram registradas nos mais diversos compartimentos ambientais, de oceanos profundos a rios continentais, e sua presença em tecidos de organismos aquáticos levanta questões científicas relevantes sobre bioacumulação, transferência trófica e efeitos toxicológicos ainda pouco compreendidos. Nesse cenário, a produção de conhecimento técnico rigoroso e replicável constitui uma contribuição essencial para o avanço da pesquisa nacional sobre o tema.

É com grande satisfação que apresento este Manual Técnico para Análises de Microplásticos em Animais, resultado do trabalho conjunto de Cândida Juliana Albertin-Santos, Laureen Michelle Houllou, Arthur Felipe Ferreira de Freitas e Geraldo Jorge Barbosa de Moura. Conheço de perto o empenho dessa equipe na consolidação de protocolos que unem precisão metodológica e aplicabilidade prática, e posso testemunhar o cuidado com que cada etapa deste manual foi pensada, testada e validada em campo e em laboratório.

A obra reúne cinco procedimentos operacionais padrão que cobrem todo o percurso analítico: da coleta de organismos em ambientes estuarinos à extração de tecidos, passando pela digestão química, pela identificação morfológica das partículas e, por fim, pela caracterização química por técnicas espectroscópicas. Trata-se de um percurso completo, descrito com o detalhamento necessário para que outros laboratórios possam reproduzi-lo com confiança, reduzindo um dos maiores desafios metodológicos da área: a padronização de procedimentos que minimizem a contaminação das amostras e garantam a comparabilidade dos resultados entre estudos.

O CETENE, como instituição vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, tem entre suas atribuições fomentar pesquisa aplicada capaz de responder a desafios concretos da sociedade brasileira. A produção deste manual se insere plenamente nessa missão. Ao sistematizar protocolos desenvolvidos a partir de estudos com peixes estuarinos do Nordeste brasileiro, a equipe do LAPAB oferece à comunidade científica uma ferramenta de referência que poderá ser adaptada a outros organismos e contextos, ampliando o alcance da pesquisa sobre poluição plástica em ecossistemas aquáticos.

Merece destaque, ainda, a parceria firmada com a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por meio do Laboratório de Estudos Herpetológicos e Paleoherpetológicas (LEHP). Essa colaboração entre o CETENE e a UFRPE exemplifica o potencial de arranjos institucionais que aproximam centros de pesquisa tecnológica e universidades públicas, combinando infraestrutura, expertise e formação de pessoal em prol de um objetivo comum. O diálogo entre as duas instituições fortalece a ciência produzida em Pernambuco e reforça o papel de Recife como polo de referência em pesquisa ambiental no Nordeste brasileiro.

Cabe destacar também o valor formativo desta publicação. Estudantes, técnicos e pesquisadores em início de carreira encontrarão aqui um guia claro sobre boas práticas laboratoriais, desde o uso adequado de equipamentos de proteção individual até os critérios de aceitação de espectros na etapa de caracterização química. Essa atenção ao detalhe reflete um compromisso mais amplo do CETENE com a formação de recursos humanos qualificados para a ciência brasileira.

Registro meu reconhecimento aos quatro autores desta obra pelo rigor técnico empregado na elaboração de cada procedimento. O resultado é um manual que honra a tradição de pesquisa aplicada do CETENE e da UFRPE e que, tenho certeza, será uma referência útil para laboratórios que se dedicam ao estudo dos microplásticos no Brasil e além de suas fronteiras.

Que esta obra inspire novos estudos e contribua para o fortalecimento da pesquisa ambiental na região Nordeste e no país.

Frederico Toscano Barreto Nogueira

Coordenador de Gestão Administrativa – COGEA

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE

APRESENTAÇÃO

Este manual técnico reúne procedimentos padronizados para a coleta, preparo, análise e caracterização de microplásticos em animais, com foco na padronização das etapas laboratoriais e na minimização de possíveis fontes de contaminação.

Os procedimentos apresentados foram desenvolvidos e padronizados a partir de estudos realizados com organismos aquáticos, tendo os peixes como principal modelo para exemplificação das etapas de coleta, preparo, processamento e análise de microplásticos. Embora alguns procedimentos sejam descritos especificamente para peixes, especialmente aqueles relacionados à coleta e à extração do trato digestivo, os princípios metodológicos apresentados podem ser adaptados a outros organismos, considerando suas características anatômicas, o tipo de tecido ou órgão analisado e os objetivos de cada estudo. As adaptações necessárias deverão ser avaliadas de acordo com a matriz biológica e, quando pertinente, previamente validadas antes de sua aplicação.

SUMÁRIO

PROCEDIMENTO DE COLETA DE ANIMAIS EM CAMPO	10
--	----

PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE TECIDOS DE ANIMAIS	16
--	----

PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO QUÍMICA EM TECIDOS	21
---	----

PROCEDIMENTO DE IDENTIFICAÇÃO MORFOTÍPICA DE MICROPLÁSTICOS	27
---	----

PREPARAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS PARA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA	32
---	----

PROCEDIMENTO DE COLETA DE ANIMAIS EM CAMPO

Objetivo

Descrever de forma detalhada os procedimentos para coleta de peixes em ambientes estuarinos com foco na análise de microplásticos (MPs), garantindo segurança, padronização metodológica e controle de contaminação.

Campo de aplicação

Este POP aplica-se às atividades de coleta de organismos aquáticos em ambientes estuarinos, destinados às análises de MPs, tendo os peixes como principal modelo de aplicação. Os procedimentos apresentados podem ser adaptados a outros grupos de organismos aquáticos, conforme as características da espécie-alvo, da área de estudo e dos objetivos da pesquisa. O procedimento foi padronizado para as campanhas de campo desenvolvidas pelo Laboratório de Pesquisas Aplicadas a Biomas (LAPAB/CETENE).

Definições

Rede de arrasto: equipamento de pesca utilizado para captura de peixes em ambientes estuarinos, com dimensões e abertura de malha definidas de acordo com a espécie-alvo e os objetivos da pesquisa.

Siglas

POP: Procedimento Operacional Padrão;

LDPE: Polietileno de Baixa Densidade;

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade;

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

Responsabilidades

Cabe aos pesquisadores autorizados pelo SISBIO a execução das coletas, garantindo o cumprimento dos protocolos descritos neste POP e o registro fiel de todas as etapas.

Condições gerais

As atividades de coleta deverão ser realizadas em condições que minimizem riscos de contaminação das amostras e garantam sua integridade durante o transporte e armazenamento. Antes do início dos procedimentos, os materiais e equipamentos deverão ser conferidos, higienizados e organizados. Durante a coleta, deverão ser evitados materiais e procedimentos que possam constituir fontes de contaminação por partículas plásticas, fibras têxteis ou outros contaminantes ambientais. Todas as amostras deverão ser devidamente identificadas e acondicionadas imediatamente após a coleta.

MATERIAL PERMANENTE

Os materiais de uso permanente necessários são: rede de arrasto de praia para a coleta dos organismos, equipamentos de proteção individual (EPIs), como luvas, botas e chapéu, para garantir a segurança da equipe durante as atividades de campo, e uma caixa térmica para o transporte adequado das amostras coletadas.



REDE DE ARRASTO



EPIs



CAIXA TÉRMICA

CONSUMÍVEIS GERAIS

Os materiais consumíveis necessários são: protetor solar e luvas para proteção da equipe; sacos plásticos transparentes de LDPE, utilizados exclusivamente para o acondicionamento individual dos peixes durante o transporte em campo; bandejas plásticas revestidas com papel-alumínio, utilizadas para acondicionamento e manipulação dos organismos coletados; além de fita crepe e caneta para identificação das amostras. Também será utilizado gelo para a eutanásia por choque térmico, conforme os protocolos éticos aplicáveis, seguido do congelamento das amostras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em laboratório.



PROTETOR SOLAR



LUVAS



SACOS PLÁSTICOS



BANDEJA



FITA CREPE



MARCADOR PERMANENTE

Procedimento técnico

As coletas deverão ser realizadas preferencialmente nas primeiras horas da manhã ou ao final da tarde, utilizando-se uma rede de arrasto de praia com dimensões e abertura de malha previamente definidas de acordo com a espécie-alvo e os objetivos da pesquisa (Albertin-Santos et al., 2026) **(a)**. Cada amostra deverá ser composta por três arrastos consecutivos e combinados ao longo da praia, com o objetivo de minimizar falhas de captura **(b)**.



Como exemplo de aplicação deste procedimento, para a coleta de *Atherinella brasiliensis* e da fauna acompanhante foram utilizados arrastos padronizados com rede de arrasto de praia de malha de 12 mm, mantendo-se as mesmas dimensões da rede durante toda a campanha. Foram realizados três arrastos por campanha e, quando necessário, arrastos adicionais para atingir o número mínimo de 20 indivíduos por área amostral, estabelecendo-se uma amostra superior à recomendada por Markic et al. (2020).

Após a captura, os animais deverão ser submetidos ao método de eutanásia aprovado no protocolo ético aplicável à espécie e à atividade de pesquisa, em conformidade com as diretrizes vigentes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) institucional, quando aplicável. No caso de utilização de choque térmico, o procedimento deverá seguir as condições estabelecidas no protocolo aprovado. Sendo assim, os peixes deverão ser submetidos a choque térmico e imersos em banho de gelo (0 a 4°C) por 10 minutos, até cessarem os movimentos operculares (**a**). Em seguida, deverão ser acondicionados individualmente em sacos de LDPE (**b**).

No retorno ao laboratório, os lotes de peixes deverão ser congelados a -20 °C até o momento do processamento. O descongelamento deverá ser realizado em temperatura ambiente. Antes da dissecação, os indivíduos deverão ser lavados externamente com água destilada previamente filtrada, visando à remoção de partículas eventualmente aderidas à superfície corporal. Em seguida, os indivíduos deverão ser identificados em nível de espécie (ROMÁN, 1977; ARAÚJO *et al.*, 2004; FISCHER *et al.*, 2011) e mensurados quanto ao comprimento padrão, comprimento total e massa corporal. O comprimento padrão deverá ser determinado com paquímetro digital (resolução de 0,01 mm), o comprimento total com paquímetro digital (resolução de 1 mm) e a massa corporal com balança digital (resolução de 1 g).



Validação e conformidades

Todos os envolvidos devem executar as atividades conforme descritas neste POP e manter registros adequados de cada etapa.

Revisão do POP

Este POP será revisado anualmente ou sempre que forem identificadas melhorias nos procedimentos.

Folha de aprovação

Instituição: Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE

Laboratório: Laboratório de Pesquisas Aplicadas a Biomas – LAPAB

Autora principal: Cândida Juliana Albertin-Santos

Coautora: Laureen Michelle Houllou

Data de elaboração e validação: 25/06/2025

Fluxograma do procedimento de coleta de animais em campo



PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE TECIDOS DE ANIMAIS

Objetivo

Estabelecer um procedimento padronizado para a dissecação e retirada do trato digestivo de peixes, garantindo a integridade da amostra e minimizando o risco de contaminação para análises laboratoriais, especialmente aquelas voltadas à detecção de MPs.

Campo de aplicação

Aplicável a laboratórios de biologia e ecotoxicologia que realizam análises de MPs em organismos aquáticos, tendo os peixes como principal modelo para a extração do trato digestivo. Os princípios metodológicos apresentados podem ser adaptados ao processamento de diferentes matrizes biológicas de outros organismos aquáticos, considerando suas características anatômicas, a matriz de interesse e os objetivos da pesquisa.

Definições

Dissecação: abertura abdominal de um organismo com fins analíticos, anatômicos ou experimentais, com a finalidade de remover estruturas internas específicas. Trato digestivo: conjunto de órgãos que compõem o sistema digestivo dos peixes, geralmente retirado desde a boca até o ânus.

Siglas

TL: Comprimento total (*Total Length*)

SL: Comprimento padrão (*Standard Length*)

Responsabilidades

A dissecação deve ser realizada exclusivamente por técnico ou pesquisador previamente treinado em anatomia de peixes e práticas seguras de manipulação laboratorial. Cabe ao responsável registrar corretamente cada etapa e garantir o uso adequado dos EPIs.

Condições gerais

Durante o procedimento, deverá ser utilizado jaleco de algodão e luvas de látex, evitando-se o uso de luvas nitrílicas e roupas de coloração azul, a fim de reduzir possíveis fontes de contaminação. Os instrumentos empregados deverão ser preferencialmente de vidro ou metal, previamente lavados com água destilada filtrada e secos em estufa. Para a dissecação e manipulação das amostras, deverão ser utilizados bisturi, pinça, tesoura, bandeja de dissecação e tubos de vidro devidamente limpos e identificados com caneta de tinta permanente, sem o uso de etiquetas adesivas. Sempre que possível, a etapa de extração deverá ser realizada sob capela de fluxo laminar, visando minimizar a contaminação ambiental das amostras.

Procedimento técnico

PREPARAÇÃO DO AMBIENTE E MATERIAIS

(Masura *et al.*, 2015)

Antes do início dos procedimentos, a bancada e a capela de fluxo laminar deverão ser higienizadas com papel-toalha e etanol 70% previamente filtrado. A área de dissecação deverá ser preparada sobre uma bandeja metálica ou plástica forrada com papel-alumínio. Em seguida, os instrumentos previamente higienizados e descontaminados, e os tubos destinados ao armazenamento das amostras deverão ser organizados, utilizando-se um tubo para cada amostra, todos devidamente codificados para garantir sua correta identificação e rastreabilidade.

MEDIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PEIXES

Albertin-Santos *et al.* (2025 a,b)

Antes da dissecação, deverão ser obtidas as medidas biométricas dos peixes utilizando régua milimetrada ou paquímetro. O comprimento total (TL) deverá ser medido do extremo anterior do focinho, com a boca fechada, até a extremidade posterior do lobo mais longo da nadadeira caudal, considerando-a em posição natural.

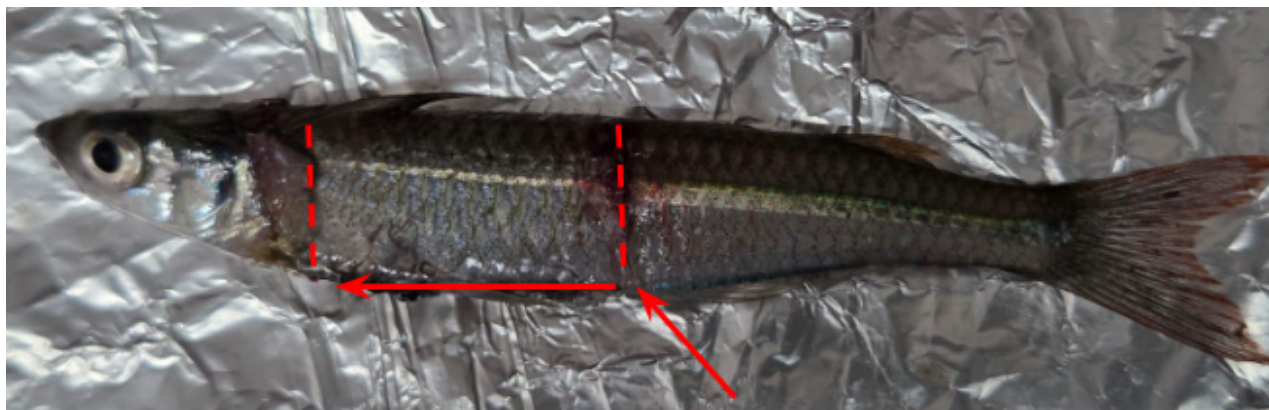
O comprimento padrão (SL) deverá ser determinado do extremo anterior do focinho até a base da nadadeira caudal, correspondente ao final da série de escamas hipurais, na região do pedúnculo caudal (**a**). Adicionalmente, a massa corporal total deverá ser determinada utilizando balança digital devidamente calibrada (**b**). Todas as medidas deverão ser registradas em planilha de campo ou laboratório. Em seguida, o peixe deverá ser submetido à lavagem externa com água destilada previamente filtrada, sendo manipulado com pinça limpa para minimizar possíveis fontes de contaminação.



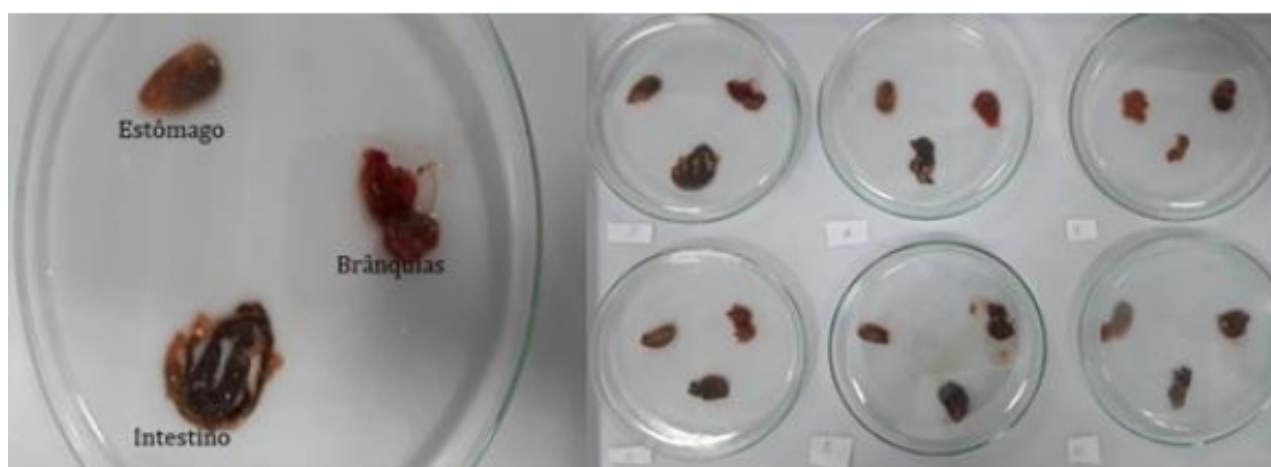
PROCEDIMENTO DE DISSECAÇÃO

Albertin-Santos *et al.* (2025a,b)

Para a dissecação, o peixe deverá ser posicionado ventralmente sobre a bandeja. Em seguida, será realizada uma incisão abdominal longitudinal com bisturi, partindo da região anal em direção à base das nadadeiras peitorais (**a**). Com auxílio de pinça e tesoura, o trato digestivo completo deverá ser removido cuidadosamente e, logo após a retirada, transferido para um tubo de vidro previamente identificado.



Caso a digestão seja iniciada imediatamente após a dissecação, o trato gastrointestinal poderá ser transferido diretamente para um béquer de vidro previamente identificado destinado ao procedimento de digestão.



ARMAZENAMENTO

Quando a digestão química não for realizada imediatamente, os tubos contendo os tratos gastrointestinais deverão ser devidamente identificados e armazenados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, organizados em caixas herméticas revestidas internamente com papel-alumínio, de modo a reduzir o risco de contaminação durante o armazenamento. Cada amostra deverá ser registrada em planilha de controle, contendo informações como espécie, data e local de coleta, código da amostra e identificação do responsável pela dissecação.

CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO

Após o processamento de cada amostra, os instrumentos utilizados deverão ser lavados com água destilada previamente filtrada antes da realização da dissecação seguinte, a fim de minimizar o risco de contaminação cruzada entre as amostras. Como controle da contaminação ambiental durante a dissecação e manipulação das amostras, deverão ser utilizados controles de exposição, constituídos por tubos de vidro sem amostra, mantidos abertos e expostos às mesmas condições ambientais e pelo mesmo período das amostras durante o procedimento de dissecação e manipulação (Masura *et al.*, 2015; Lusher *et al.*, 2017; Bessa *et al.*, 2019; Albertin-Santos *et al.*, 2025 a,b).

Validação e conformidades

O cumprimento integral das etapas descritas neste POP é essencial para assegurar a padronização, rastreabilidade e qualidade dos resultados analíticos.

Revisão do POP

Este POP será revisado anualmente, ou sempre que forem necessárias alterações motivadas por novas evidências técnicas, sugestões de melhoria ou mudanças no protocolo de pesquisa.

Folha de aprovação

Instituição: Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE

Laboratório: Laboratório de Pesquisas Aplicadas a Biomas – LAPAB

Autora principal: Cândida Juliana Albertin-Santos

Coautora: Laureen Michelle Houllou

Data de elaboração e validação: 25/06/2025

PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO QUÍMICA EM TECIDOS

Objetivo

Descrever o protocolo para digestão química com KOH 10% de tecidos animais para liberação de MPs.

Campo de aplicação

Aplicável em laboratórios que realizam análise de MPs em tecidos animais, com foco na digestão de conteúdo do trato digestivo de organismos aquáticos.

Definições

Digestão química: processo de decomposição de material biológico com reagente químico para separação de resíduos não orgânicos, como MPs.

Siglas

KOH: Hidróxido de potássio;

GF/F: Filtro de fibra de vidro (GF/F), 47 mm, retenção nominal de 0,7 µm.

Responsabilidades

A digestão química deve ser realizada por pesquisadores ou técnicos qualificados, responsáveis por todas as etapas do processo, incluindo preparo do reagente, manipulação das amostras, controle de qualidade (blanks) e registros técnicos.

Condições gerais

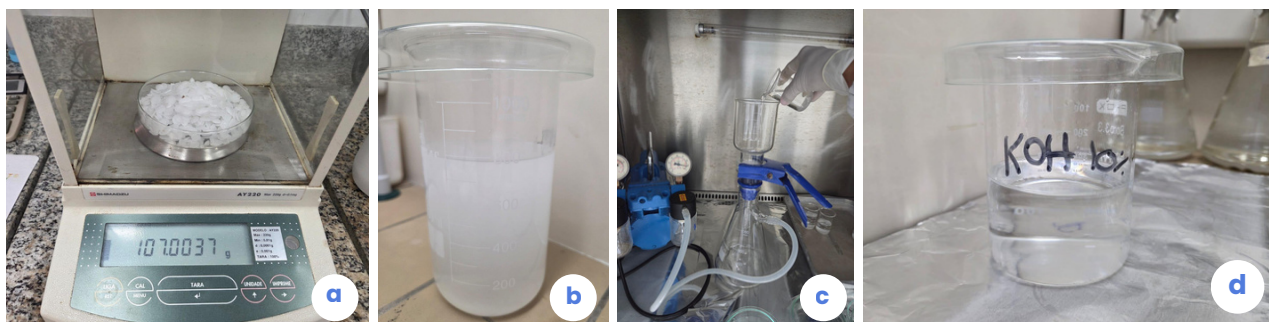
Durante o processamento das amostras, deverá ser utilizado jaleco confeccionado em tecido 100% algodão e luvas descartáveis de látex, evitando-se o uso de materiais sintéticos que possam constituir fonte de contaminação. As vidrarias e os utensílios metálicos deverão estar devidamente higienizados com água destilada previamente filtrada e etanol 70% filtrado. Todos os reagentes utilizados, incluindo a solução de KOH a 10%, a água destilada e o etanol 70%, deverão ser previamente filtrados antes do uso. As etapas de manipulação e processamento das amostras deverão ser realizadas, sempre que possível, sob capela de fluxo laminar, visando minimizar a contaminação por partículas e fibras presentes no ambiente. O preparo de soluções e demais etapas que envolvam risco químico deverão ser realizados sob capela de exaustão, quando aplicável. Para o controle da contaminação ambiental e procedimental, deverão ser utilizados controles em branco para cada conjunto de até 10 amostras.

Procedimento técnico

PREPARAÇÃO DO REAGENTE KOH A 10%

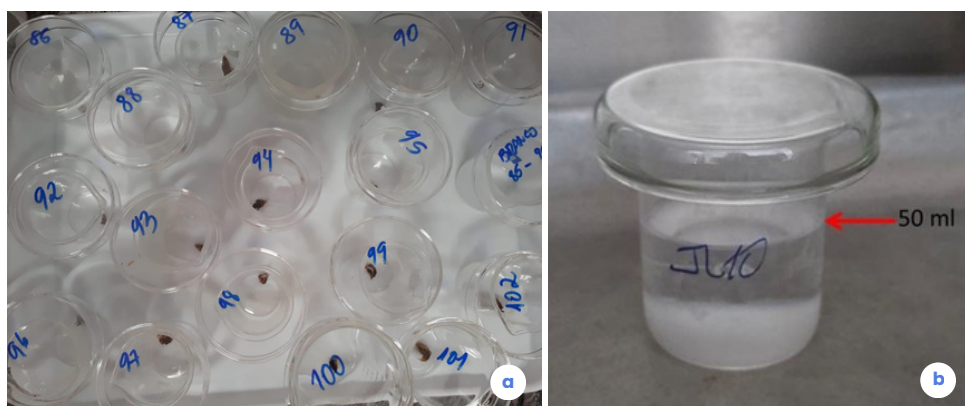
Para o preparo da solução de KOH a 10% (m/v), a massa de hidróxido de potássio (KOH) deverá ser calculada de acordo com o teor (pureza) informado pelo fabricante, de forma a garantir a concentração final desejada. Para uma solução de 100 mL, deverão ser utilizados 10 g de KOH, com correção da massa de acordo com a pureza do reagente. Após a pesagem, o KOH deverá ser transferido para um béquero de vidro e a água destilada adicionada gradualmente, sob agitação com bastão de vidro, até sua completa dissolução **(a)**. Devido ao caráter exotérmico da dissolução, a solução deverá ser mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente e, posteriormente, o volume deverá ser ajustado ao volume final desejado com água destilada **(b)**. Em seguida, a solução deverá ser homogeneizada e filtrada com auxílio de bomba de vácuo e filtro GF/F de 0,7 μ m ALBERTIN-SANTOS *et al.* (2025); JUSTINO *et al.* (2021); FERREIRA *et al.* (2023) **(c)**.

Por fim, deverá ser armazenada em recipiente de vidro limpo e devidamente identificado com caneta de tinta permanente (**d**).



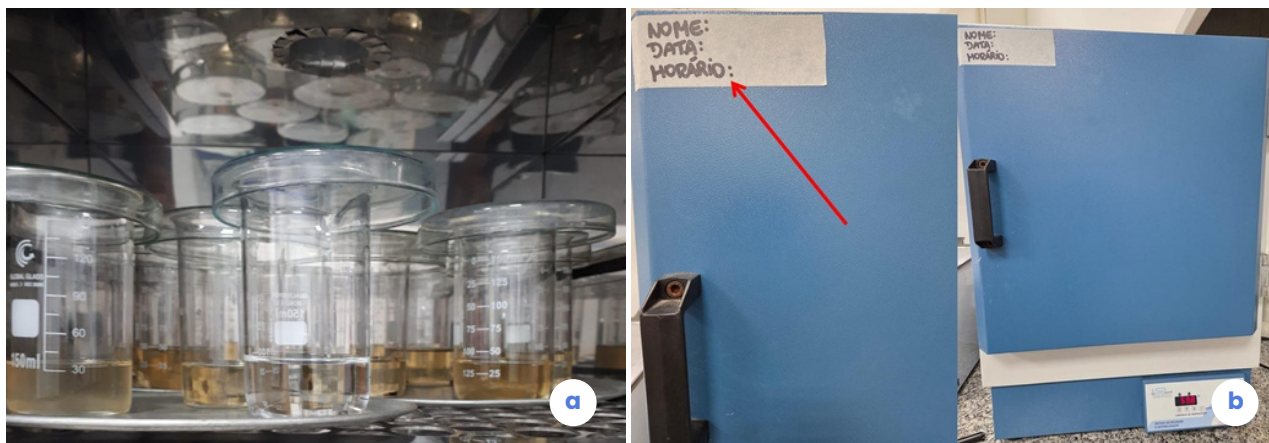
PREPARO DAS AMOSTRAS

Inicialmente, a capela deverá ser higienizada e as bandejas organizadas com béqueres de vidro de 50 mL (**a**). Cada amostra de trato digestivo, com massa aproximada entre 0,5 e 2,0 g, deverá ser transferida para um béquer limpo e mantida coberta com uma tampa de placa de Petri. Em seguida, deverá ser adicionada solução de KOH 10% até completar o volume de 50 mL por amostra (**b**). Para amostras com massa superior a 2,0 g, o volume de KOH 10% deverá ser aumentado de acordo com a massa e as características da amostra, de modo a garantir quantidade suficiente de reagente para a adequada digestão do material biológico. Para o controle de possíveis contaminações durante o processamento, deverá ser preparado um branco processual, sem tecido biológico, para cada conjunto de até 10 amostras. Quando for identificada uma partícula suspeita de MPs no branco, sua ocorrência deverá ser considerada na avaliação das amostras pertencentes ao mesmo conjunto analítico. Partículas que apresentem características compatíveis com aquelas observadas no branco, como cor e morfologia, não deverão ser contabilizadas nas respectivas amostras. A ocorrência das partículas identificadas no branco deverá ser registrada e considerada na apresentação dos resultados.



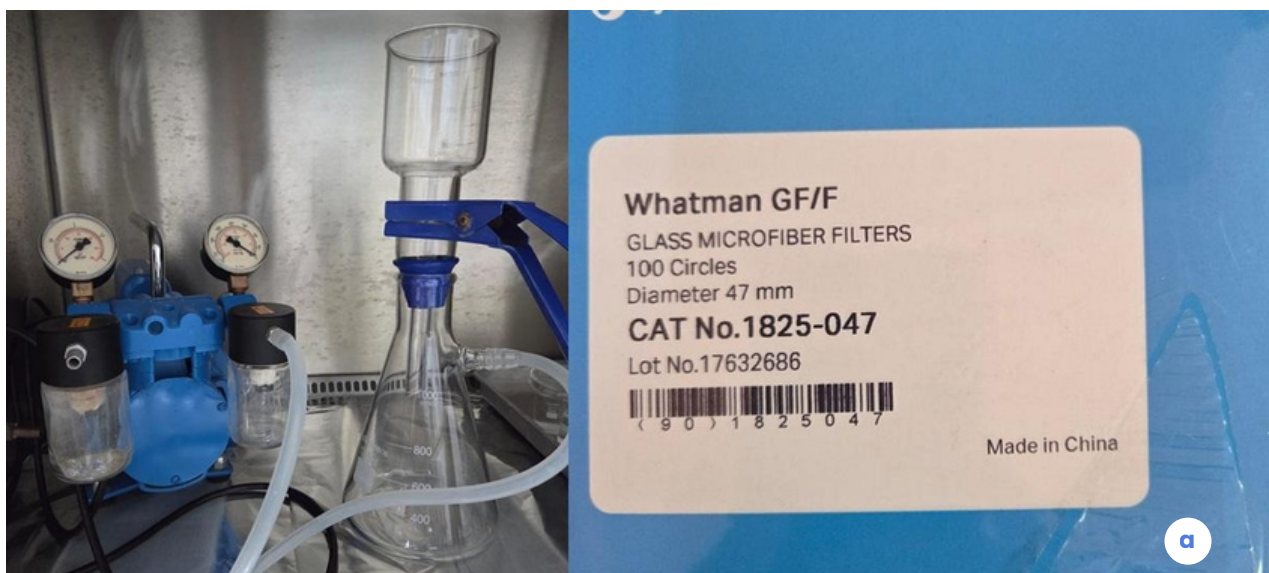
DIGESTÃO

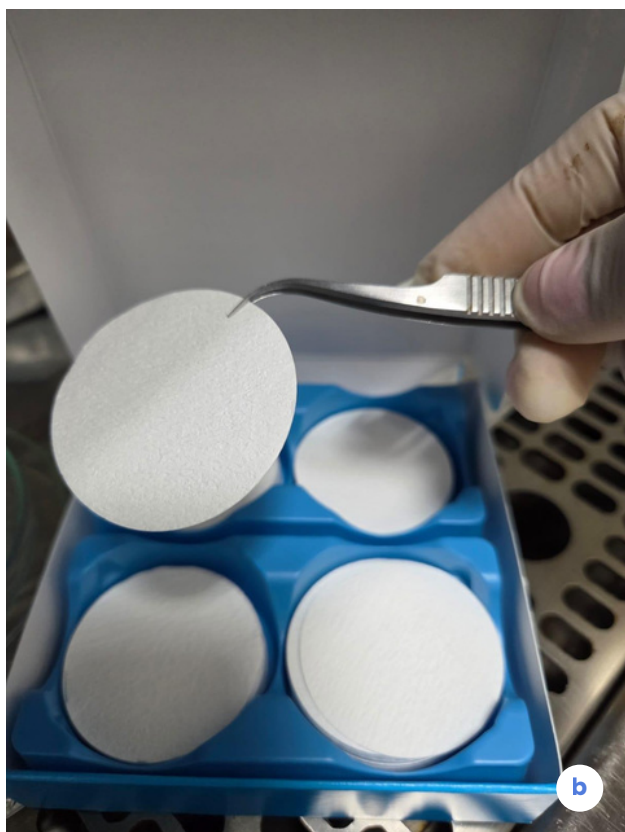
Após a adição do reagente, os béqueres deverão ser levados à estufa, previamente ajustada a 60 °C, onde deverão permanecer por 24 horas para a digestão das amostras (**a**). Durante esse período, o conteúdo deverá ser misturado periodicamente com bastão de vidro para garantir sua homogeneização.



FILTRAÇÃO

Após 24 horas de digestão, cada amostra deverá ser filtrada sob capela de fluxo laminar, utilizando sistema de filtração a vácuo com filtros GF/F de 47 mm e porosidade de 0,7 µm (**a**). Os filtros deverão ser manipulados com pinça metálica previamente lavada (**b**). O conteúdo de cada béquer deverá ser transferido cuidadosamente para o sistema de filtração (**c**) e, ao final, o béquer deverá ser lavado com água destilada previamente filtrada, de modo a garantir a transferência completa da amostra para o filtro.





SECAGEM E ARMAZENAMENTO

Após a filtração, os filtros deverão ser levados à estufa a 60 °C por 8 horas, para garantir a secagem completa. Em seguida, deverão ser acondicionados individualmente em placas de Petri devidamente identificadas e armazenados em caixas plásticas herméticas revestidas internamente com papel-alumínio, permanecendo protegidos até a etapa de análise em estereomicroscópio.



CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO

Todas as etapas do processamento das amostras deverão ser realizadas sob rigoroso controle de qualidade, visando minimizar o risco de contaminação cruzada entre as amostras e de contaminação proveniente do ambiente.

Durante todas as análises, deverão ser utilizados jalecos confeccionados em tecido 100% algodão e luvas descartáveis de látex. Antes do início e ao término de cada rotina de trabalho, todos os instrumentos, equipamentos e superfícies deverão ser higienizados com etanol 70% previamente filtrado e água destilada filtrada. Sempre que possível, deverão ser utilizados exclusivamente materiais de vidro e metálicos, evitando o uso de utensílios plásticos. As soluções de hidróxido de potássio (KOH 10%), água destilada e etanol 70% deverão ser previamente filtradas antes de sua utilização (Bessa *et al.*, 2019). Para monitorar possíveis contaminações durante o processamento das amostras, deverão ser preparados brancos processuais (*procedural blanks*), submetidos às mesmas etapas analíticas das amostras, contendo apenas os reagentes utilizados no procedimento. Deverá ser processado, no mínimo, um branco processual para cada conjunto de até 10 amostras. Os resultados obtidos nos brancos deverão ser avaliados conjuntamente com as amostras, sendo utilizados para verificar a integridade analítica do procedimento e identificar possíveis fontes de contaminação (Lusher *et al.*, 2017; Bessa *et al.*, 2019; Albertin-Santos *et al.*, 2025).

Validação e conformidades

Todos os procedimentos deverão seguir rigorosamente este protocolo, com registros precisos em planilhas ou formulários próprios, datados e assinados pelos responsáveis.

Revisão do POP

Este POP será revisado anualmente ou sempre que forem implementadas melhorias metodológicas ou identificadas falhas na execução.

Folha de aprovação

Instituição: Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE

Laboratório: Laboratório de Pesquisas Aplicadas a Biomas – LAPAB

Autora principal: Cândida Juliana Albertin-Santos

Coautora: Laureen Michelle Houllou

Data de elaboração e validação: 25/06/2025

PROCEDIMENTO DE IDENTIFICAÇÃO MORFOTÍPICA DE MICROPLÁSTICOS

Objetivo

Estabelecer um protocolo padronizado para análise visual, categorização e registro de MPs extraídos de amostras biológicas, com base em critérios morfológicos observados sob estereomicroscópio.

Campo de aplicação

Aplicável a filtros secos contendo resíduos sólidos não digeríveis oriundos da digestão química de tecidos, especialmente trato digestivo de peixes, visando à identificação e à caracterização preliminar de MPs.

Definições

Microplásticos (MPs): partículas plásticas com tamanho inferior a 5 mm, provenientes da degradação de plásticos maiores ou fabricadas intencionalmente em microescala. Morfotipo: classificação física dos MPs com base em sua forma: fibras, fragmentos, pellets, filmes ou esferas (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Bank, 2022; Hale *et al.*, 2022).

Siglas

MPs: Microplásticos;

Responsabilidades

A análise deverá ser realizada em ambiente limpo e livre de possíveis fontes de contaminação por fibras têxteis e poeira. Os filtros, previamente secos, deverão ser mantidos e manipulados exclusivamente no interior de placas de Petri fechadas. A observação das amostras deverá ser realizada em estereomicroscópio ZEISS Discovery.V8, ou equipamento equivalente, acoplado a sistema de captura de imagens. Para fins de padronização deste procedimento, serão analisadas partículas com dimensões $\geq 20 \mu\text{m}$.

Condições gerais

Durante o processamento das amostras, deverá ser utilizado jaleco de algodão e luvas de látex, evitando-se, sempre que possível, materiais sintéticos que possam constituir fontes potenciais de contaminação. As vidrarias e os utensílios metálicos deverão estar devidamente higienizados com água destilada previamente filtrada. Os reagentes, incluindo a solução de KOH a 10%, bem como os solventes utilizados, deverão ser filtrados antes do uso. A manipulação das amostras deverá ser realizada, sempre que possível, sob capela de fluxo laminar, previamente higienizada, visando minimizar o risco de contaminação por partículas e fibras presentes no ambiente. Para o controle da contaminação ambiental e procedimental, deverão ser utilizados controles em branco para cada conjunto de até 10 amostras.

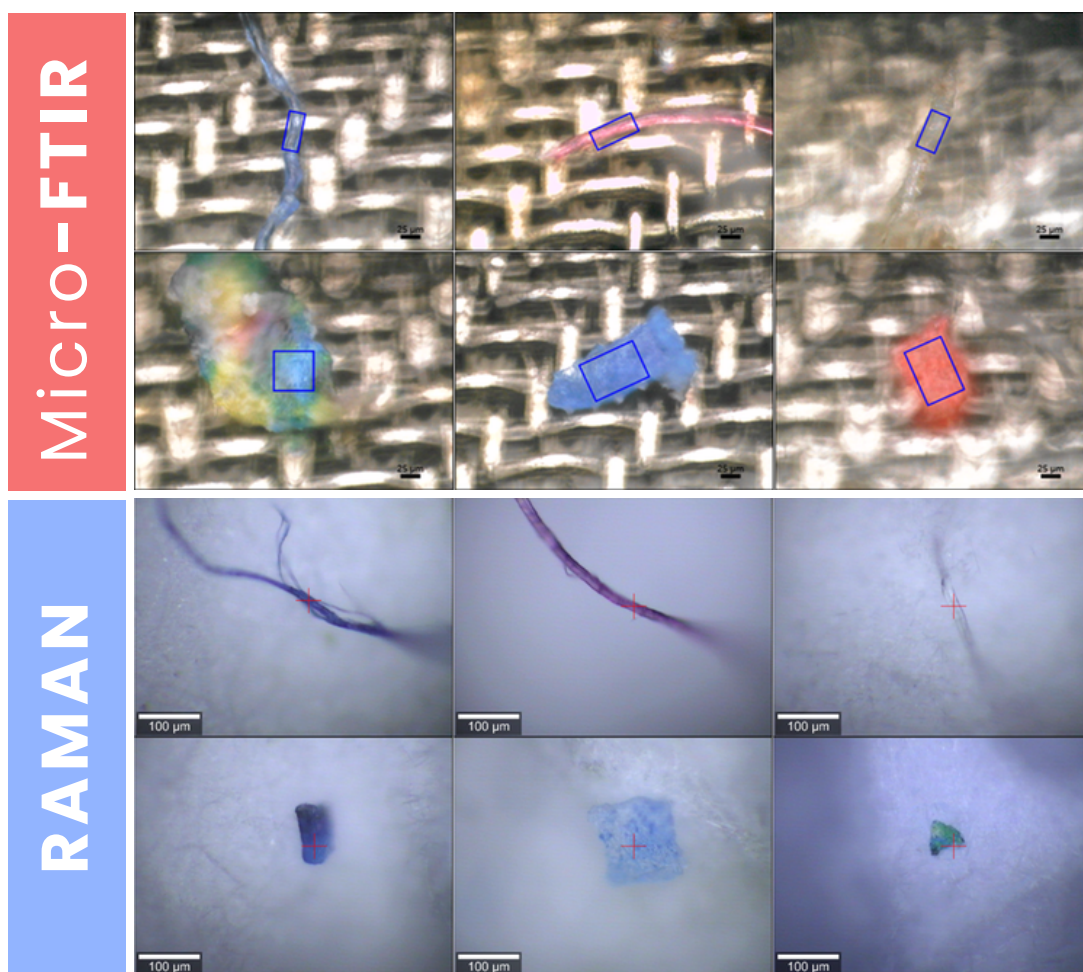
Procedimento técnico

PREPARAÇÃO DO AMBIENTE E DOS MATERIAIS

Antes do início da análise, a bancada e os equipamentos deverão ser higienizados com etanol 70% previamente filtrado. Os filtros deverão ser posicionados em placas de Petri devidamente identificadas, que deverão permanecer fechadas durante toda a análise visual, sendo abertas apenas quando estritamente necessário e, preferencialmente, sob capela de fluxo laminar. Em seguida, o estereomicroscópio deverá ser ajustado quanto à iluminação, e a câmera deverá ser devidamente calibrada para garantir a adequada visualização e o registro das partículas.

ANÁLISE VISUAL

A observação do filtro deverá ser realizada diretamente através da tampa da placa de Petri, utilizando estereomicroscópio equipado com câmera integrada e iluminação adequada, evitando sua abertura durante a análise para minimizar o risco de contaminação aérea e perda de partículas. As partículas com características compatíveis com MPs deverão ser consideradas partículas suspeitas e classificadas visualmente de acordo com o morfotipo, podendo ser categorizadas como fibra, fragmento, pellet, filme ou esfera. Também deverão ser registradas a cor e o comprimento de cada partícula, determinado por meio do sistema de aquisição de imagens do estereomicroscópio, previamente calibrado. A classificação visual deverá ser considerada uma etapa de triagem, não sendo suficiente, isoladamente, para confirmar a natureza polimérica das partículas. Todas as informações obtidas deverão ser registradas em planilha padronizada ou software específico para triagem e organização dos dados.



REGISTRO FOTOGRÁFICO

As partículas identificadas como possíveis MPs deverão ser fotografadas utilizando o sistema de captura de imagens acoplado ao estereomicroscópio. Durante o registro, a placa de Petri deverá permanecer fechada para minimizar o risco de contaminação. Os arquivos de imagem deverão ser nomeados de forma padronizada, contendo o código da amostra e a identificação correspondente de cada partícula registrada.

ARMAZENAMENTO E ORGANIZAÇÃO DE DADOS

Todas as observações obtidas durante a análise deverão ser registradas em planilha padronizada, contendo o código da amostra, tipo de MPs, cor, forma, tamanho e eventuais observações adicionais. Após a análise, as placas de Petri deverão ser novamente armazenadas em caixas herméticas, revestidas internamente com papel alumínio e devidamente identificadas, garantindo a proteção e organização das amostras até etapas posteriores.

Validação e conformidades

Todos os profissionais envolvidos devem seguir estritamente os procedimentos descritos neste POP. A rastreabilidade dos resultados deve ser assegurada por registros completos e assinaturas dos responsáveis técnicos.

Revisão do POP

Este POP será revisado anualmente, ou sempre que forem identificadas melhorias nos critérios de análise ou na infraestrutura laboratorial.

Folha de aprovação

Instituição: Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE

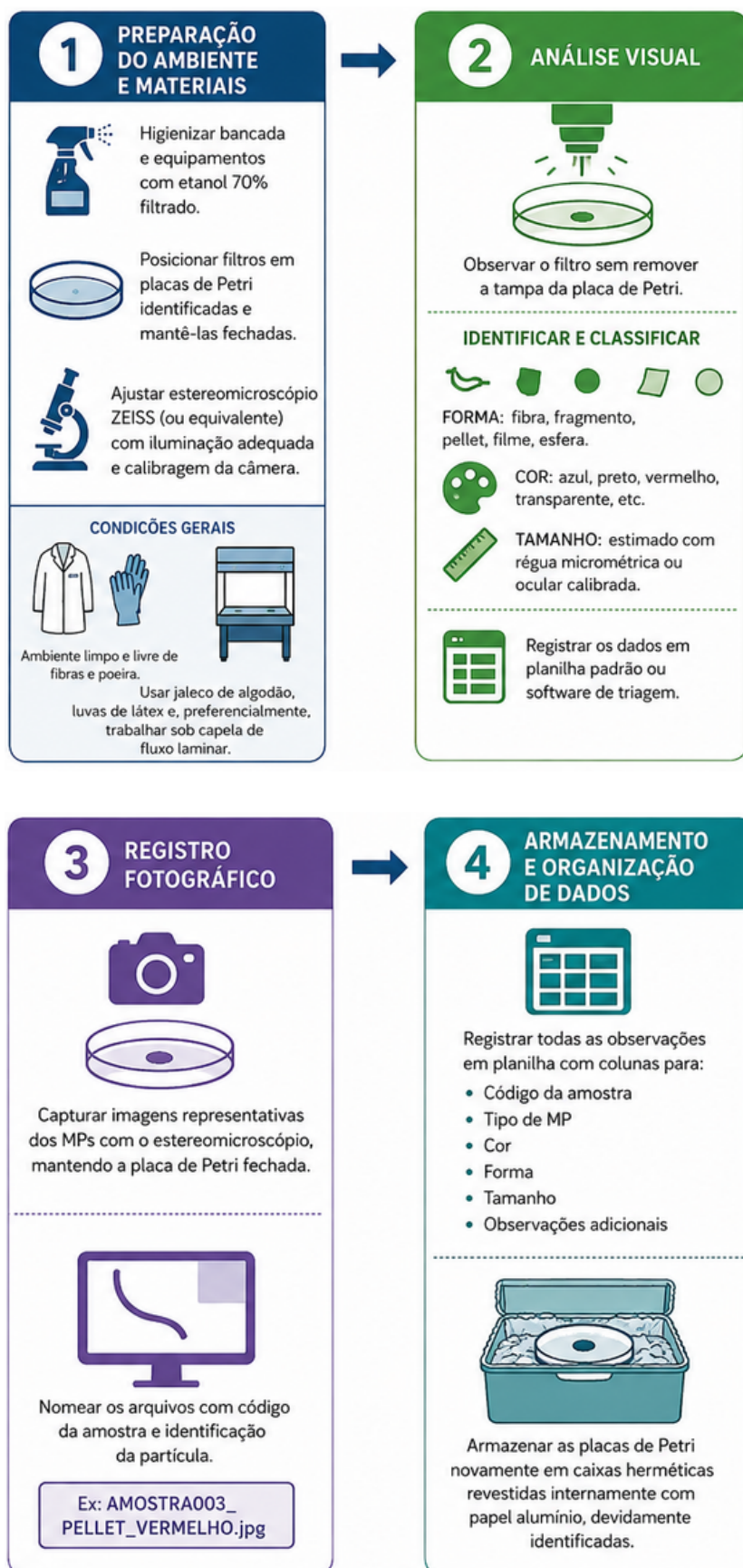
Laboratório: Laboratório de Pesquisas Aplicadas a Biomas – LAPAB

Autora principal: Cândida Juliana Albertin-Santos

Coautora: Laureen Michelle Houllou

Data de elaboração e validação: 25/06/2025

Fluxograma do procedimento de análise morfológica de microplásticos



PREPARAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS PARA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA

Objetivo

Padronizar os procedimentos para seleção, organização e preparo de partículas suspeitas de MPs destinadas à caracterização química por técnicas espectroscópicas, visando à identificação do tipo de polímero.

Campo de aplicação

Aplicável à preparação de partículas suspeitas de MPs isoladas de amostras biológicas ou ambientais para posterior caracterização química por espectroscopia Raman, micro-FTIR, FTIR ou técnicas equivalentes, visando à identificação da composição polimérica.

Definições

Caracterização química: etapa destinada à confirmação da natureza polimérica das partículas por técnicas analíticas apropriadas, como espectroscopia Raman, micro-FTIR, FTIR ou métodos equivalentes. Subamostragem: seleção representativa de partículas com base em atributos visuais (tamanho, cor, forma) para análise química (Lusher *et al.*, 2020; Galgani *et al.*, 2023).

Siglas

MPs: Microplásticos.

Responsabilidades

A caracterização química deve ser realizada por profissional capacitado na técnica espectroscópica empregada, com domínio do equipamento utilizado, dos softwares de aquisição e processamento de espectros e da interpretação baseada em bibliotecas espectrais validadas (Masura *et al.*, 2015; Bessa *et al.*, 2019).

Condições gerais

A subamostragem deverá ser realizada de forma representativa, contemplando diferentes cores, formas e tamanhos de MPs. O ambiente de preparação e análise deverá permanecer limpo, com controle rigoroso de possíveis fontes de contaminação. As placas de Petri deverão ser mantidas fechadas, e a região onde os MPs forem visualizados deverá ser marcada externamente com caneta permanente, facilitando sua localização e agilizando a análise espectral posterior (Masura *et al.*, 2015; Lusher *et al.*, 2020; Bessa *et al.*, 2019).

Procedimento técnico

SELEÇÃO DA SUBAMOSTRA

Após a análise morfológica, deverá ser selecionada uma subamostra representativa dos MPs, considerando a diversidade de formas, cores, tamanhos e locais de coleta (Lusher *et al.*, 2020). Sempre que possível, deverão ser priorizadas partículas de maior dimensão, por apresentarem maior área disponível para análise, e partículas com menor quantidade de material aderido, reduzindo possíveis interferências na caracterização química. A quantidade de partículas selecionadas poderá variar de acordo com os objetivos do estudo, a disponibilidade analítica e o protocolo adotado pelo laboratório.

CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DA SUBAMOSTRA

A seleção das partículas deverá considerar a representatividade das formas, cores e classes de tamanho observadas, bem como sua distribuição entre as diferentes amostras ou locais de coleta. Também deverão ser considerados o estado de conservação das partículas e sua disponibilidade para realização das análises posteriores (Lusher *et al.*, 2020; Galgani *et al.*, 2023).

MARCAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os filtros deverão ser mantidos em placas de Petri fechadas. A região da tampa correspondente ao local onde os MPs forem visualizados deverá ser marcada externamente com caneta de tinta permanente, utilizando quadrantes ou outros pontos de referência para facilitar sua localização. Também deverão ser registrados o código da amostra, o número e o tipo de MPs selecionados, além da posição indicada na placa.

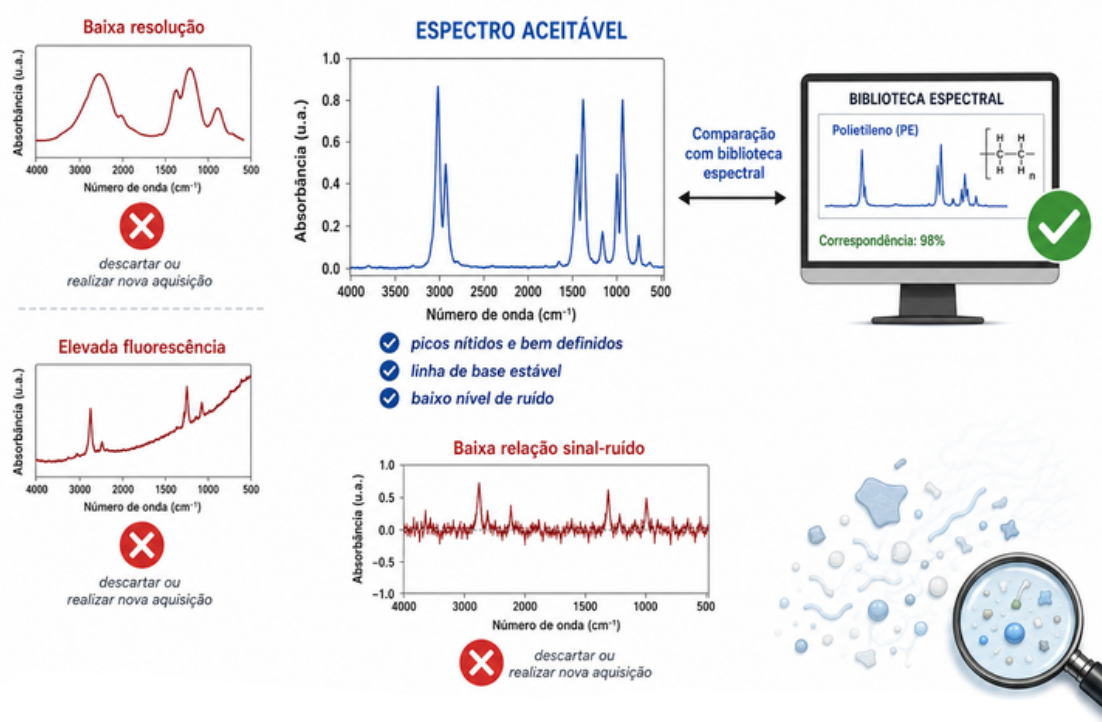
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

As partículas selecionadas deverão ser preparadas ou posicionadas conforme o procedimento específico da técnica espectroscópica utilizada. Os parâmetros instrumentais deverão ser definidos de acordo com a técnica e o equipamento empregado, seguindo as recomendações do fabricante e os procedimentos validados pelo laboratório. Para cada análise, deverão ser registrados, quando aplicáveis, o comprimento de onda do laser, a potência utilizada, o tempo de aquisição, o número de acumulações e a resolução espectral. Sempre que possível, diferentes regiões da superfície da partícula deverão ser analisadas para aumentar a confiabilidade da identificação (Käppler *et al.*, 2016; Primpke *et al.*, 2018; Cowger *et al.*, 2021). Nos casos de fluorescência, baixa resolução ou outras interferências, os parâmetros instrumentais deverão ser ajustados ou, quando necessário, deverá ser utilizada uma técnica espectroscópica alternativa (Käppler *et al.*, 2016; Primpke *et al.*, 2018).

IDENTIFICAÇÃO DOS POLÍMEROS

Os espectros obtidos deverão ser comparados com bibliotecas espectrais validadas para a técnica utilizada, seguindo critérios de qualidade e identificação espectral descritos na literatura (Primpke *et al.*, 2018; Cowger *et al.*, 2021). No protocolo adotado pelo laboratório, partículas com índice de similaridade $\geq 70\%$ e qualidade espectral adequada deverão ser consideradas identificações confirmadas.

Resultados com índice de similaridade inferior a 70% poderão ser considerados identificações tentativas quando apresentarem evidências espectrais compatíveis com determinado polímero e houver justificativa técnica para a redução do índice de similaridade, como fluorescência, baixa intensidade do sinal, interferências ou outras limitações analíticas. Nesses casos, a identificação deverá ser registrada como tentativa e devidamente justificada. Partículas que não apresentarem evidências suficientes para atribuição a um polímero deverão ser classificadas como não identificadas. Todos os espectros deverão ser salvos com a identificação da amostra e organizados em pastas de acordo com o local de coleta e o tipo de partícula.



CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO DO ESPECTRO

A identificação química somente deverá ser considerada válida quando o espectro apresentar qualidade suficiente para comparação com bibliotecas espectrais validadas, atendendo aos critérios mínimos de similaridade estabelecidos pelo laboratório ou pelo software utilizado. Espectros com baixa resolução, elevada fluorescência ou baixa relação sinal-ruído deverão ser descartados ou submetidos a nova aquisição utilizando parâmetros instrumentais alternativos (Primpke *et al.*, 2018; Cowger *et al.*, 2021).

Validação e conformidades

O cumprimento rigoroso deste POP é essencial para a rastreabilidade e validade dos resultados obtidos. As etapas devem ser documentadas em planilhas técnicas específicas, incluindo: identificação da amostra, tipo de partícula, espectro gerado, polímero identificado, software de processamento utilizado, biblioteca espectral empregada e operador responsável.

Revisão do POP

Este POP será revisado anualmente ou sempre que novos equipamentos ou metodologias analíticas, critérios espectrais ou métodos de subamostragem forem adotados.

Folha de aprovação

Instituição: Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE

Laboratório: Laboratório de Pesquisas Aplicadas a Biomas – LAPAB

Autora principal: Cândida Juliana Albertin-Santos

Coautora: Laureen Michelle Houllou

Data de elaboração e validação: 25/06/2025

Referências

- Albertin-Santos, C.J., Ferreira, E.J.G. & Zuanon, J. Taxonomic composition and trophic guild structure of fish assemblages on Amazonian lake beaches and their relationships with local environmental variables. *Environ Biol Fish* 109, 110 (2026). <https://doi.org/10.1007/s10641-026-01882-0>
- Albertin-Santos, C.J., Ferreira, G.V.B., Justino, A.K.S., Lucena-Frédou, F., Houllou, L.M., 2025a. Does the trophic guild influence microplastic ingestion in nursery areas? A case study on a southwestern Atlantic mangrove-dominated estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 221, 118559. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.118559>.
- Albertin-Santos, C.J., Ferreira, G.V.B., Justino, A.K.S., Lucena-Frédou, F., Houllou, L.M., 2025b. Microplastic contamination in *Atherinella brasiliensis*: Insights into plastic pollution in mangrove ecosystems of the Southwestern Atlantic. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 89, 104316. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2025.104316>.
- Araújo, M.E., 2004. Peixes Estuarinos Marinhos do Nordeste Brasileiro. Editora Universitária UFPE, Recife.
- Bank, M.S. (Ed.), 2022. Microplastic in the Environment: Pattern and Process. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-78627-4>.
- Bessa, F., Barría, P., Neto, J.M., Frias, J.P.G.L., Otero, V., Sobral, P., Marques, J.C., 2019. Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 128, 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.044>.
- Cowger, W., Gray, A., Guiling, J., Fong, P.P., Waldschläger, K., et al., 2021. Microplastic spectral classification needs an open source community: Open Specy to the rescue! *Anal. Chem.* 93, 7543–7548. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00123>.
- De Frond, H., Cowger, W., Renick, V., Brander, S., Primpke, S., Sukumaran, S., Christiansen, S., 2023. What determines accuracy of chemical identification when using microspectroscopy for the analysis of microplastics? *Chemosphere* 313, 137300. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137300>.
- Ferreira, G.V.B., Justino, A.K.S., Eduardo, L.N., Schmidt, N., Martins, J.R., Ménard, F., Fauvelle, V., Mincarone, M.M., Lucena-Frédou, F., 2023. Influencing factors for microplastic intake in abundant deep-sea lanternfishes (Myctophidae). *Sci. Total Environ.* 867, 161478. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161478>.
- Fischer, L.G., Pereira, L.E.D., Vieira, J.P., 2011. Peixes Estuarinos e Costeiros. 2nd ed. Luciano Gomes Fischer, Rio Grande.
- Galgani, F., Ruiz-Oregon, L.F., Ronchi, F., Tallec, K., Fischer, E., Matiddi, M., Anastasopoulou, A., Andresmaa, E., Angiolillo, M., Bakker, M.P., Booth, A.M., Buhalko, N., Cadiou, B., Claro, F., Consoli, P., Darmon, G., Deudero, S., Fleet, D.M., Fortibuoni, T., et al., 2023. Guidance on the Monitoring of Marine Litter in European Seas: An Update to Improve the Harmonised Monitoring of Marine Litter under the Marine Strategy Framework Directive. JRC Technical Report No. 133594. Publications Office of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/10.2760/59137>.
- Hale, R.C., Seeley, M.E., King, A.E., Yu, L.H., 2022. Analytical chemistry of plastic debris: Sampling, methods, and instrumentation. In: Bank, M.S. (Ed.), *Microplastic in the Environment: Pattern and Process*. Springer, Cham, pp. 17–55. https://doi.org/10.1007/978-3-030-78627-4_2.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3060–3075. <https://doi.org/10.1021/es2031505>.
- Justino, A.K.S., Lenoble, V., Pelage, L., Ferreira, G.V.B., Passarone, R., Frédou, T., Lucena-Frédou, F., 2021. Microplastic contamination in tropical fishes: An assessment of different feeding habits. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 45, 101857. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101857>.
- Käppler, A., Fischer, M., Scholz-Böttcher, B.M., Oberbeckmann, S., Labrenz, M., Fischer, D., 2016. Comparison of μ -ATR-FTIR spectroscopy and Raman microscopy for the analysis of microplastics in environmental samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 8377–8391. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9956-3>.
- Lusher, A.L., Welden, N.A., Sobral, P., Cole, M., 2017. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Anal. Methods* 9, 1346–1360. <https://doi.org/10.1039/C6AY02415G>.
- Lusher, A.L., Welden, N.A., Sobral, P., Cole, M., 2020. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. In: *Analysis of Nanoplastics and Microplastics in Food*. CRC Press, Boca Raton, pp. 119–148.
- Markic, A., Gaertner, J.-C., Gaertner-Mazouni, N., Koelmans, A.A., 2020. Plastic ingestion by marine fish in the wild. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 50, 657–697. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1631990>.
- Masura, J., Baker, J.E., Foster, G.D., Arthur, C., Herring, C., 2015. Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for Quantifying Synthetic Particles in Waters and Sediments. NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-48. Marine Debris Program, National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD.
- Primpke, S., Wirth, M., Lorenz, C., Gerds, G., 2018. Reference database design for the automated analysis of microplastic samples based on Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 5131–5141. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1156-x>.
- Román, B., 1977. Peces Marinos de Venezuela. *Memorias de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle* 37, 106.



CETENE
CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
UNIÃO E RECONSTRUÇÃO