

Técnica semiautomatizada para identificação de microplásticos de PVC: avaliação dos efeitos do envelhecimento por radiação ultravioleta C pela análise de entropia de imagens por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia FTIR

Semi-automated technique for identification of polyvinyl chloride microplastics: Evaluation of aging by ultraviolet-C radiation through entropy analysis of scanning electron microscopy images and Fourier transform infrared spectroscopy

Ana Clara Maccarini Colombo^{1*} , Rodrigo Braga Moruzzi¹ ,
Amanda Maria Dantas de Jesus¹ , Fabiana Alves Fiore¹ , Rogério Galante Negri¹ 

RESUMO

Este estudo visou estabelecer as bases para uma metodologia semiautomatizada de identificação e quantificação de micropartículas de policloreto de vinila (MP-PVC) em amostras ambientais, utilizando o corante vermelho do Nilo (NR) e análise de entropia de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, foi estabelecido protocolo para o NR e para visualização do MP-PVC. A exposição à radiação ultravioleta (UV-C) controlada foi usada para simular o envelhecimento do MP-PVC. A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi usada para medir as alterações químicas do MP-PVC. Os resultados apresentam o melhor protocolo para o uso do NR. O envelhecimento induziu alterações significativas na morfologia e composição química dos MP-PVC, acelerando os processos de degradação. A análise por MEV, combinada com a quantificação da entropia das imagens, permitiu monitorar, com base em teste estatístico, a progressão da degradação, evidenciando o aumento da complexidade e heterogeneidade da superfície das partículas ao longo do tempo. Os resultados do FTIR corroboraram aqueles identificados por meio do MEV com entropia monitorada, indicando a ocorrência de processos de oxidação. A combinação dessas técnicas proporcionou a caracterização dos efeitos do envelhecimento por UV-C no MP-PVC, contribuindo para o desenvolvimento de ferramentas mais eficientes para a identificação e o monitoramento desses poluentes em amostras ambientais.

Palavras-chave: microplásticos; policloreto de vinila; análise semiautomática; vermelho do Nilo.

ABSTRACT

This study aims to establish the foundations for a semi-automated methodology to identify and quantify polyvinyl chloride microplastics (MP-PVC) in environmental samples, utilising Nile Red (NR) dye and entropy analysis of scanning electron microscopy (SEM) images. A specific protocol for NR staining and MP-PVC visualisation was developed. Controlled UV-C radiation exposure was used to simulate the aging process of MP-PVC. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was employed to measure the chemical alterations in MP-PVC. The results identified the optimal NR staining protocol. Aging significantly altered the morphology and chemical composition of MP-PVC, accelerating degradation processes. SEM analysis, coupled with image entropy quantification, enabled monitoring based on statistical testing of the degradation progression, highlighting increased surface complexity and heterogeneity over time. FTIR results corroborated SEM observations, confirming oxidation processes and other chemical modifications. The combination of these techniques offers a comprehensive characterisation of UV-C aging effects on MP-PVC, contributing to the development of more effective tools for monitoring and managing these pollutants in aquatic environments.

Keywords: microplastic; polyvinyl chloride; semi-automatic analysis; Nile Red.

¹Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Ciência e Tecnologia - São José dos Campos (SP), Brasil.

*Endereço para correspondência: Estrada Dr. Altino Bondesan, 500 - Eugênio de Melo - CEP: 12247-016 - São José dos Campos (SP), Brasil. e-mail: anaclaramc08@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Os microplásticos (MPs) são contaminantes emergentes que figuram como desafio global (TADSUWAN; BABEL, 2021) por causa da sua ocorrência generalizada no ambiente e dos seus potenciais riscos aos organismos e à saúde humana (GAO; CIZDZIEL; CHEN, 2023). As partículas plásticas menores que 5 mm são consideradas MPs e podem ser classificadas como primárias ou secundárias. As primárias são aquelas advindas de produtos de higiene, de aplicações domésticas ou industriais. Já as secundárias são derivadas da fragmentação do material plástico originário de ações intempéricas tanto físicas quanto químicas (KOELMANS *et al.*, 2022).

Atualmente, estudos têm demonstrado que o envelhecimento dos MPs pode alterar a estrutura da sua superfície e composição química (LIU *et al.*, 2021). Por esse motivo, a previsão do comportamento do MP a longo prazo no meio ambiente é um tópico relevante, no entanto o principal desafio é a lenta degradação dos MPs em condições naturais, causada pela pouca exposição à radiação ultravioleta (UV), pelos efeitos biológicos e pelo calor (ZURIER; GODDARD, 2020). Para identificação dos efeitos da degradação do material em longo prazo, como alternativa aos processos naturais, podem ser empregados métodos tecnológicos de envelhecimento em laboratório, acelerando-o pelo aumento na intensidade dos fatores degradantes, como, por exemplo, irradiação de luz UV-C (LIU *et al.*, 2021).

As partículas de MPs apresentam grande intercorrelação de formatos, densidades, tamanhos e composição, além de grande capacidade dispersiva (MAZZONI *et al.*, 2024), o que dificulta o desenvolvimento de metodologias padronizadas que sejam eficazes para identificação do poluente (KOELMANS *et al.*, 2022). A caracterização dos MPs não deve ser limitada apenas pela determinação de sua microestrutura, mas deve envolver procedimentos multianalíticos, com técnicas complementares entre si. Para que um método seja adequadamente aplicado e subsidie todas as características do material, ele deve ponderar também a composição da superfície do MP (ZHANG; WANG; CHEN, 2022). Destaca-se, assim, a importância da padronização de metodologias para a identificação de

MPs, superando os desafios associados à diversidade de partículas em amostras ambientais e à necessidade de técnicas complementares para uma caracterização completa.

A quantificação de MPs por procedimento óptico pode ser aplicada como uma primeira etapa de identificação, já que permite a diferenciação do material polimérico para outros materiais presentes na amostra, determinando sua quantidade, morfologia e estrutura (VASUDEVA *et al.*, 2025). Conforme Gómez *et al.* (2024), a identificação de MPs em amostras ambientais contendo material orgânico pode ser realizada pela microscopia, sem pigmentação das partículas, após a digestão da matéria orgânica e filtração da amostra. As técnicas de identificação visual são variadas, podendo ser por contagem manual, que normalmente é um processo complicado e demorado, ou por métodos de estereomicroscopia, microscopia por fluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (WOO *et al.*, 2021).

Uma das dificuldades do processo óptico é a grande diversidade de partículas presentes em amostras ambientais, sendo difícil isolar os MPs dos demais materiais presentes. Nesse sentido, o uso do corante fluorescente seletivo vermelho do Nilo, ou, em inglês, *Nile red* (NR), tem se mostrado promissor. Esse corante é pouco solúvel em água e detentor de grande capacidade de dissolução em solventes orgânicos (RUMIN *et al.*, 2015). O uso do NR associado à iluminação com comprimento de onda adequado permite localizar MPs ocultos na amostra, já que, uma vez aderido a superfícies hidrofóbicas, como plásticos, resulta em fluorescência intensa. Em contrapartida, quando o NR está em estado livre, sua fluorescência é mínima (CHATTERJEE *et al.*, 2023). Vale ressaltar que, apesar de esse pigmento ter sido aplicado em uma série de estudos para identificação de MPs, existe uma grande variação relativa às metodologias de pigmentação com diferentes efeitos nas amostras de plástico. Ademais, o envelhecimento dos MPs quando sujeitos às intempéries, de modo especial a ação dos raios UV, altera suas propriedades físico-químicas, modificando a interação com o pigmento.

Metodologias de degradação térmica, como a pirólise seguida de cromatografia, são eficientes para identificação

e quantificação de MPs quando se deseja compreender a quantidade de contaminação de amostras alimentícias e ambientais com partículas plásticas, entretanto esse tipo de análise pode ser demorado, principalmente quando comparado com metodologias como espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (IVLEVA, 2021). Entre as maneiras de identificação da morfologia do MP, a dispersão dinâmica de luz pode ser uma alternativa, pois permite a medição de seu tamanho hidrodinâmico, no entanto essa técnica não favorece a quantificação da concentração de partículas suspensas (ZHANG; WANG; CHEN, 2022). Já para a identificação química, utilizam-se técnicas como FTIR e micro-Raman (SHRUTI *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de procedimento automatizado de contagem pode aumentar a confiança e encurtar o tempo de resposta requerido para tomada de decisão em tempo adequado. As técnicas de análise automática apresentam vantagens para uma grande diversidade de estudos na área ambiental, porque podem facilitar a obtenção de resultados mais precisos, bem como garantir a padronização de averiguação de amostras.

O presente trabalho teve como objetivo aprimorar a identificação e a quantificação de MPs-PVC, utilizando o corante NR e a microscopia óptica. Também visou contribuir com a proposição de uma ferramenta semiautomática, multianalítica e qualiquantitativa para monitoramento da progressão do envelhecimento dos MPs-PVC, por meio da entropia de imagens de MEV, com base em teste estatístico, e análises de FTIR.

METODOLOGIA

Preparação das soluções

O MP-PVC utilizado tinha tamanho aproximado de 105 µm e a aparência de um fino pó branco. Para preparação de sua solução, os MPs foram adicionados na água destilada em concentração arbitrária de 30 mg/L e foram adicionadas quatro gotas de *Extran* para quebra da tensão superficial do MP e garantia de uma solução mais homogênea. Já a solução do corante reativo NR foi preparada em duas concentrações, 0,1 e 10 mg/L, em metanol. As soluções

de NR foram acondicionadas em vidro âmbar e estocadas em geladeira a 9°C, a fim de evitar o processo de degradação da solução.

Teste de pigmentação dos microplásticos

Para determinação da melhor forma de pigmentação, foram testadas duas formas de inserção do pigmento na amostra. Na primeira, o pigmento NR foi inserido diretamente na solução padrão de MP, que posteriormente foi filtrada em membrana de fibra de vidro, com poros de 0,7 µm. Na segunda, fez-se a filtração de 100 mL da solução padrão de MP na membrana. Depois, a pigmentação do MP foi realizada por meio da disposição do NR diretamente na superfície do filtro. O objetivo dos testes foi definir a melhor técnica de pigmentação, o volume de solução de trabalho ideal e a concentração de NR. As variáveis foram combinadas como mostrado no Quadro 1.

Os melhores resultados de pigmentação foram escolhidos para prosseguimento do estudo. Todas as metodologias de preparação do pigmento e análises das amostras foram realizadas em período menor que 24 horas, a fim de evitar perdas de luminescência do MP. Os brancos dos procedimentos foram realizados utilizando a solução padrão de MP na mesma concentração e volume dos demais testes, porém sem a etapa de pigmentação. Após a filtração, pigmentação por NR e secagem das diferentes amostras, as imagens de microscopia foram adquiridas.

Quadro 1 - Condições estudadas para membrana de fibra de vidro

Teste	Concentração de NR em metanol (mg/L)		Volume de solução de NR inserida (ml)		Método de inserção de NR	
	0,1	10	0,5	1	Pré-filtração	Após filtração
1	X		X		X	
2	X			X	X	
3		X	X		X	
4		X		X	X	
5	X			X		X
6		X		X		X

NR: vermelho do Nilo.
Fonte: elaborado pelos autores.

Estudo das variáveis ópticas: microscopia

Para análise qualitativa da coloração das amostras, foi utilizado um estereomicroscópio com foco motorizado M205 C (Leica), com algumas adaptações, como sugerido por Labbe, Bagshaw e Uttal (2020). Para isso, foram utilizadas folhas de papel transparente e flexível (tipo celofane) nas cores amarela e verde, como filtros de luz, e adicionou-se também iluminação auxiliar por meio de um canhão de luz acoplado, para facilitar o direcionamento da luminosidade.

Pelas imagens dos MPs no microscópio, foram verificadas as variáveis que implicam a aquisição de imagens: intensidade de cada tipo de filtro, coloração do filtro acoplado à objetiva, temperatura e presença de filtro relativos à luz auxiliar, porcentagem de brilho da luz principal, uso ou não de *laser* e as variáveis do *software* (ganho e exposição). Para a realização das avaliações das amostras por microscopia, foram feitas ampliações de imagem de 25 e 160 vezes, de modo que fosse possível a visualização de forma mais pontual e ampliada.

Processo de envelhecimento por radiação ultravioleta C e identificação por microscopia eletrônica de varredura e FTIR

O envelhecimento dos MPs foi simulado em laboratório por meio da exposição à radiação UV-C artificial. O objetivo foi acelerar a fotodegradação, imitando os efeitos da exposição solar de longo prazo em um período mais curto. O tempo de envelhecimento simulado foi calculado com base na intensidade da radiação UV utilizada no experimento e na radiação UV anual natural média do Brasil. A razão da intensidade de radiação entre o experimento e as condições ambientais foi calculada conforme Lin *et al.* (2020) e Han *et al.* (2021). De forma simplificada, a estimativa é realizada igualando das doses (intensidade da radiação \times tempo) a que estão submetidas as amostras em ambientes naturais e controlados.

Para tal, 30 g do MP não pigmentados por NR foram submetidas à radiação UV-C (100 a 280 nm) por meio da exposição a um conjunto de seis lâmpadas Philips TUV de 15 W cada uma, acopladas a um reator. O reator, montado em caixa feita de alumínio com comprimento de 45 cm, 38 cm de largura e 18 de altura, visa acelerar o envelhecimento natural, conforme descrito por Lin *et al.* (2020). O conjunto promove por dia 9 kWh/m², resultando em

fator de aceleração mínimo aproximado da ordem de 20 (razão entre o tempo na natureza e o tempo de laboratório necessário para a exposição à mesma dose).

As amostras foram submetidas ao envelhecimento no intervalo de quatro, seis e 11 dias ininterruptos a 23°C e 40% de umidade do ar. O Quadro 2 mostra a identificação das amostras e a quantidade de dias em que foram submetidas ao envelhecimento mecânico acelerado.

O efeito do UV-C sobre as partículas foi avaliado pelo monitoramento de atributos de textura e rugosidade das imagens obtidas em MEV, modelo MEV Quanta 250 (FEI), com magnificação de duas mil, cinco mil e 20 mil vezes. Antes das análises, todas as amostras de MPs passaram pelo processo de metalização com ouro, para melhoria da condutividade.

Após a aquisição das imagens via microscopia, o *software* ENVI 5.6 (ENVI, 2009) foi utilizado para o cálculo de atributos de textura propostos por Haralick, Shanmugan e Dinstein (1973), sendo eles: média, variância, homogeneidade, contraste, dissimilaridade, entropia, segundo momento e correlação. Mais especificamente, tais medidas são computadas por meio da matriz de coocorrência de níveis de cinza, a qual representa a distribuição conjunta das frequências com que os níveis digitais (ou níveis de cinza) são observados na vizinhança de cada *pixel* da imagem quando comparados com o deslocamento estabelecido pelo usuário (GONZALEZ; WOODS, 2002). No contexto deste estudo, foi identificado via experimentação que vizinhanças de dimensão 3 \times 3 e deslocamentos de um *pixel* nas direções vertical e horizontal (*i.e.*, $\Delta h = \Delta v = 1$) favorecem a geração de padrões de textura mediante as imagens analisadas. Ademais, após observação cuidadosa dos atributos de textura extraídos, apenas a entropia revelou potencial para a análise em questão.

Quadro 2 - Identificação e dias de envelhecimento das amostras de microplásticos

Identificação das amostras	Dias de envelhecimento
0	Sem envelhecimento (controle)
1	4
2	6
3	11

Fonte: elaborado pelos autores.

Formalmente, seja I uma imagem constituída de m linhas e n colunas, $I(x, y) = i$ indica que o *pixel* que ocupa a linha x e coluna y apresenta nível digital igual a i . Posto isto, $C(i, j, \Delta h, \Delta v)$ representa a distribuição conjunta com que os valores de níveis digitais i e j são observados quando uma vizinhança V (i.e., uma sub-região espacial de dimensão específica) centrada na posição (x, y) é comparada com a vizinhança similar de centro $(x + \Delta h, y + \Delta v)$. Tal distribuição é sumarizada na Equação 1.

$$C(i, j, \Delta h, \Delta v) = \sum_{(x, y) \in V} \delta(x, y, \Delta h, \Delta v) \quad (1)$$

Em que:

$\delta(i, j, \Delta h, \Delta v) = 1$ se $(I(x, y) = i) \wedge (I(x + \Delta h, y + \Delta v) = j)$.
Caso contrário, $\delta(i, j, \Delta h, \Delta v) = 0$.

Com base na distribuição representada por tal matriz associada à posição (x, y) , o atributo de textura denominado de entropia é definido pela Equação 2 (ESPINOSA; BAILÓN; LAGUNA, 2021).

$$E(x, y) = -Z_{ij} \log(Z_{ij}) \quad (2)$$

Em que:

Z_{ij} = a frequência relativa à ocorrência de $C(i, j, \Delta h, \Delta v)$;
para $x = 1, \dots, m$ e $y = 1, \dots, n$.

Ainda, para comparar os efeitos dos diferentes tempos de envelhecimento, foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon com nível de confiança de 90%. Para análise química do efeito da ação da radiação UV-C, empregou-se a FTIR utilizando um espectrofotômetro modelo Prestige 21 (Shimadzu) que avaliou as amostras com zero, quatro, seis e 11 dias de envelhecimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pigmentação dos microplásticos

No decorrer do procedimento identificativo, evidenciou-se que as diferentes metodologias de pigmentação promoviam resultados distintos. As membranas 1, 2 e 5, pigmentadas com a solução do corante na concentração de 0,1 mg/L,

apresentaram os menores graus de pigmentação, e em suas imagens de microscopia sem ampliação não foram verificadas partículas pigmentadas. As membranas com tingimento mais relevante foram 3, 4 e 6, todas com concentração de NR de 10 mg/L, revelando que essa concentração foi a que produziu os resultados mais satisfatórios relativos ao objetivo da pesquisa, ainda que, conforme destacado por Shruti *et al.* (2022), a concentração de 1 mg/mL tenha sido aplicada na maioria dos estudos por eles ponderados.

Entre as amostras com concentração de 10 mg/L, a pigmentação da membrana 3 foi a menos nítida, apesar de ser viável identificar aglomerados de MPs nas imagens sem ampliação. Quando aplicada a ampliação de 160 vezes, não foi possível distinguir os MPs com facilidade, por causa da sua baixa luminescência, podendo ainda serem confundidos com a rugosidade da membrana. As duas pigmentações mais promissoras foram as das amostras 4 e 6, o que permite concluir que o volume mais indicado para melhores visualizações é de 1 mL. Condições semelhantes foram descritas por Hengstmann e Fischer (2019), que aplicaram o mesmo volume de corante com o NR solubilizado em clorofórmio, e Meyers *et al.* (2022), com dissolução em acetona. A maior luminescência também foi percebida nas membranas submetidas à aplicação de NR diretamente em sua superfície.

Estudo das variáveis ópticas: microscopia

A realização de diferentes combinações entre as variáveis ópticas primordialmente testadas por Labbe, Bagshaw e Uttal (2020) evidenciou que algumas propiciavam melhores resultados na aquisição das imagens. O filtro verde apresentou melhor resposta quando acoplado na objetiva, enquanto a camada de filtro amarelo deveria ter sido alocada juntamente com a luz auxiliar. O aumento da quantidade de camadas do papel celofane apenas gera o escurecimento das imagens, e não significa melhor visualização das partículas plásticas. Assim, utilizou-se apenas uma camada de filtro amarelo e verde.

Observou-se que a luz auxiliar de coloração branca apresentou melhor resposta que o *laser* verde, que ocasionava a degradação acelerada da amostra, verificada na perda de coloração por parte do material polimérico.

A obtenção das imagens geradas por diferentes arranjos de variáveis ópticas permitiu definir que a melhor combinação se refere a brilho da iluminação principal em 0% e coloração de iluminação auxiliar de 3,050 k. As configurações de *software* utilizadas foram: exposição de 101 ms e ganho de 45. A imagem obtida das métricas e variáveis definidas como padrão é apresentada na Figura 1.

Pela imagem de microscopia mostrada na Figura 1, foi possível observar que, além de minúsculas partículas de MP pigmentadas, aglomerados maiores reagiram totalmente com o corante NR. Destaca-se que a utilização de microscopia para entendimento do envelhecimento de MPs é muito difundida, entretanto conta-se com o fator de subjetividade do entendimento humano para análise das imagens obtidas, podendo então não ser o método mais eficaz para respostas precisas e padronizadas. Tais resultados convergem com aqueles verificados por Lu *et al.* (2023),

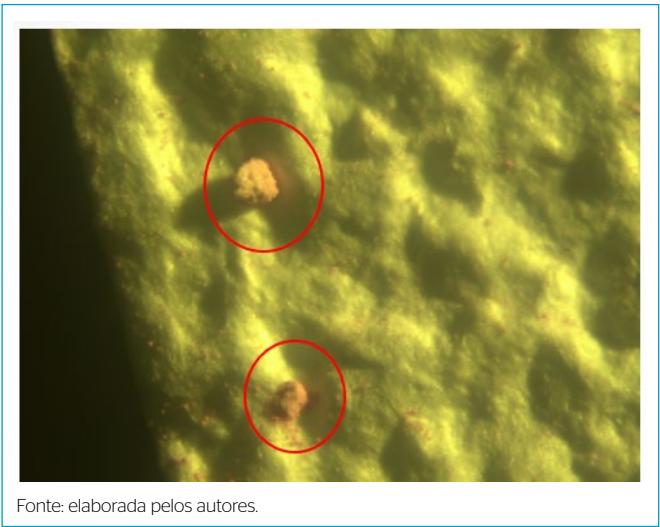


Figura 1 - Microscopia do melhor resultado (Teste 11) com pigmentação por vermelho do Nilo

que orientam o seu empregado apenas para observações preliminares de macromorfologia, coloração e estrutura da superfície do MP.

Processo de envelhecimento por radiação ultravioleta C e identificação por microscopia eletrônica de varredura e FTIR

As amostras envelhecidas foram avaliadas por meio da microscopia aplicando-se as melhores condições de pigmentação e variáveis ópticas determinadas em etapa preliminar da pesquisa. Os resultados das medições do diâmetro de partículas aleatórias verificadas nas imagens obtidas do estereomicroscópio estão na Tabela 1.

A análise dos valores médios dos diâmetros das partículas plásticas envelhecidas em diferentes tempos evidenciou que quanto maior o tempo de envelhecimento menor o valor médio do diâmetro. Assim, por mais que algumas medidas de diâmetro da amostra 3 ainda sejam equiparáveis àquelas visualizadas na amostra sem envelhecimento, na média, as partículas são menores. Tais resultados são corroborados por Lin *et al.* (2020), que verificaram que o envelhecimento das partículas por intermédio de radiação UV-C propicia a quebra do MP em partículas ainda menores. Sabe-se que o tempo de envelhecimento das partículas adotado neste estudo ainda não é representativo das características de MPs que podem ser encontradas em amostras ambientais. Dessa forma, infere-se que, quanto mais envelhecidas são as amostras, mais acentuadas serão as quebras e diminuições de intensidade de luminescência.

Os resultados também evidenciaram que, quanto mais envelhecidas as amostras, mais fortes eram as colorações roxas verificadas no perímetro das partículas plásticas diretamente em contato com a membrana, podendo indicar o aumento

Tabela 1 - Medidas de diâmetro dos microplásticos

Medidas (μm)							
	1	2	3	4	5	6	Média das medidas
Amostra 0	32,91	14,54	13,39	15,00	24,86	17,09	19,60
Amostra 1	21,06	12,6	14,78	17,67	17,00	10,32	15,60
Amostra 2	19,17	19,11	5,89	16,68	9,60	11,36	13,60
Amostra 3	8,11	22,2	7,58	9,74	24,12	4,87	12,80

Fonte: elaborada pelos autores.

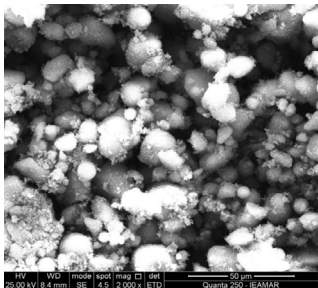
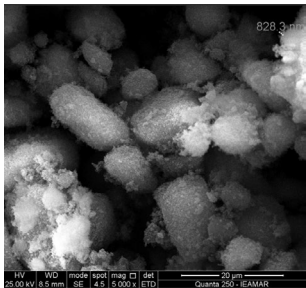
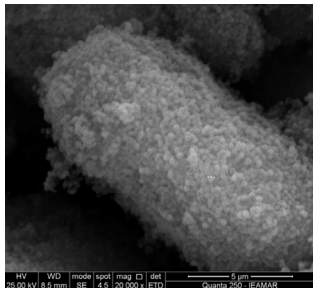
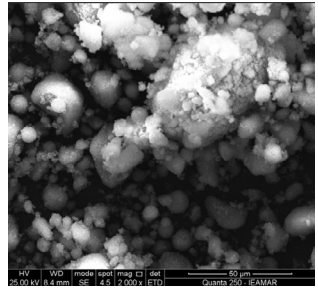
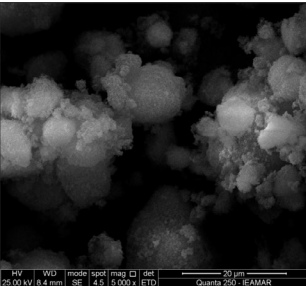
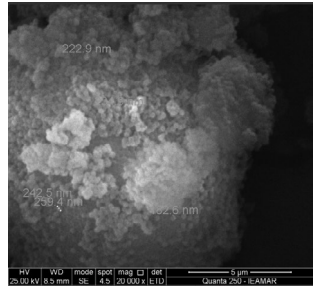
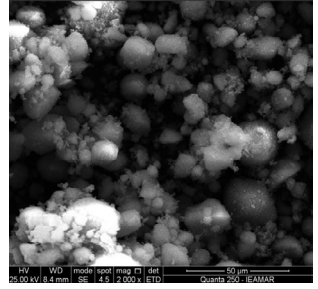
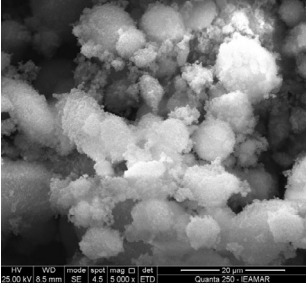
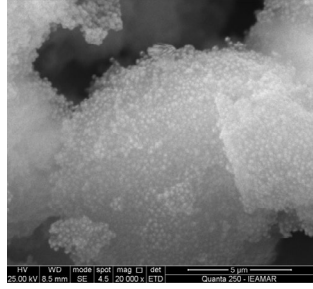
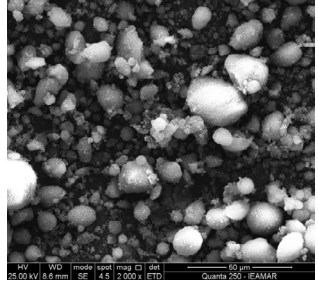
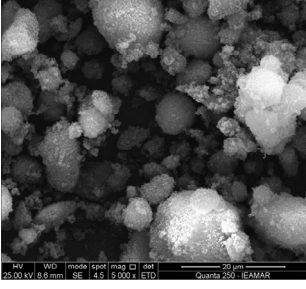
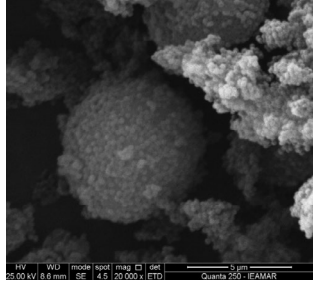
da superfície de contato e a deposição do pigmento em tais localidades, dada a mudança na rugosidade das partículas plásticas decorrente da radiação UV-C, como também relatado por Luo *et al.* (2022). O processo de envelhecimento por UV-C realizado nesta pesquisa mostrou a ocorrência de mudanças na coloração das micropartículas plásticas. Os MPs novos detinham coloração esbranquiçada, já os MPs mais envelhecidos se tornaram mais amarelados, o que corrobora com o apresentado por Li *et al.* (2022), que comprovaram

a reação de oxidação do material por causa da sua coloração amarelada, após 24 dias de envelhecimento por radiação UV em partículas de MPs de poliestireno, poliamida e polietileno. De acordo com He *et al.* (2023), esse é um dos indicadores de envelhecimento efetivo do MP.

Análise por microscopia eletrônica por varredura

O Quadro 3 apresenta as imagens do MEV obtidas para as partículas de MP, divididas em função da sua magnificação.

Quadro 3 - Efeito do envelhecimento analisado em microscopia eletrônica de varredura

Identificação da amostra	Dias de envelhecimento	Ampliação 2k	Ampliação 5k	Ampliação 20k
0	Sem envelhecimento			
1	4			
2	6			
3	11			

Fonte: elaborado pelos autores.

Os resultados evidenciam que as imagens com magnificação de duas mil vezes com envelhecimento de 11 dias aparentam ter diminuído de tamanho quando comparadas às partículas de MP sem envelhecimento e com quatro dias de envelhecimento.

Verificada a dificuldade de avaliação dos MPs de forma visual, as imagens foram submetidas a métodos numéricos analíticos. Tornou-se imprescindível identificar se a magnificação seria um fator de influência nos resultados das análises numéricas. Por isso, os valores de entropia, para cada um dos tempos de envelhecimento, correlacionados às suas respectivas magnificações, foram apresentados na Figura 2.

Por meio da Figura 2 é possível observar que os níveis de magnificação não influenciaram de forma direta a entropia média de cada um dos tempos de envelhecimento. Dessa maneira, infere-se ser possível a análise de apenas uma magnificação, como representativa das demais. Em vista disso, foi escolhida a magnificação de dois mil para que a entropia fosse analisada com maior detalhamento em diferentes níveis de cinza na imagem em 2^8 bits. A Figura 3 mostra o comportamento das entropias

relacionadas a cada faixa de nível de cinza, para os períodos de envelhecimento estudados, quatro, seis e 11 dias.

Na Figura 3 é possível verificar que, em algumas condições, a medida de entropia é sensível às alterações de

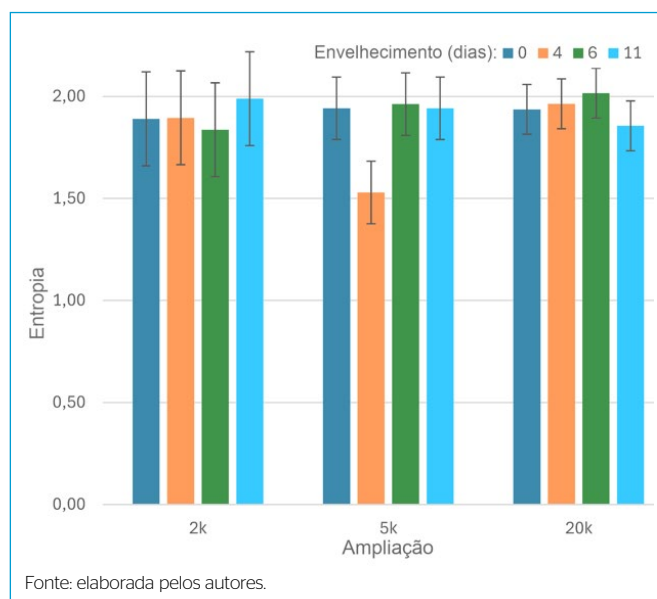
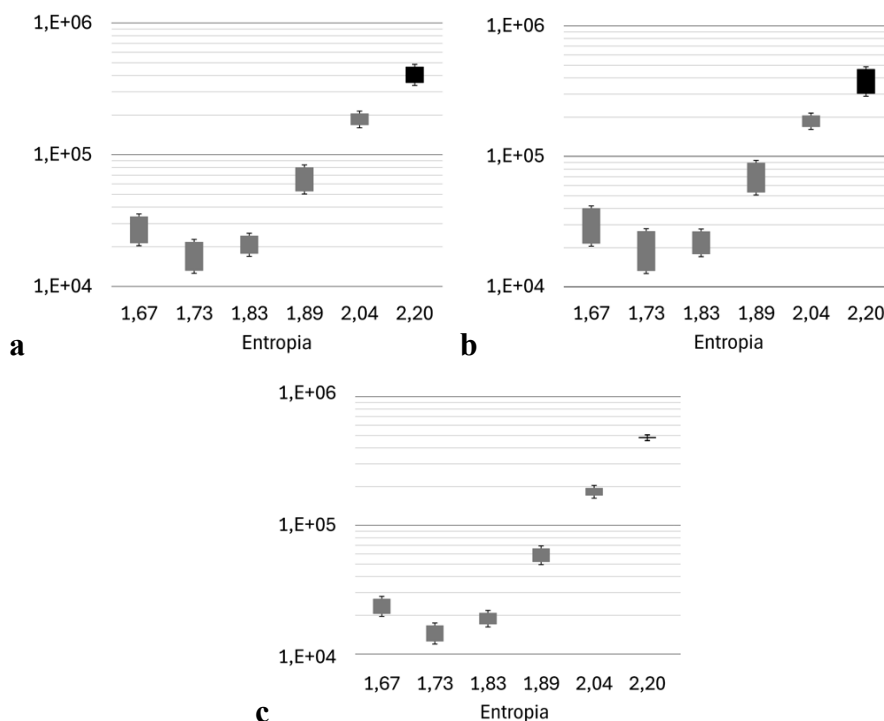


Figura 2 - Efeito da magnificação das imagens da microscopia eletrônica por varredura no parâmetro entropia média



Fonte: elaborada pelos autores.

Figura 3 - Entropia em diferentes dias de envelhecimento: (a) quatro, (b) seis, (c) 11 dias

textura afetadas pelo envelhecimento, sendo possível atestar que é uma variável importante para o entendimento do envelhecimento sob as partículas poliméricas. Para valores de entropia maiores que 2, existem maiores diferenças em relação aos tempos de envelhecimento estudados. A distribuição de *pixel* se concentra nas maiores classes de entropia, sendo mais marcada para os intervalos de quatro e seis dias.

Os resultados do teste paramétrico de Wilcoxon indicaram que não há diferença estatisticamente significativa entre os períodos de envelhecimento de quatro e seis dias ($p = 0,256$), contudo a comparação entre o período de 11 dias de envelhecimento e os períodos de quatro ($p = 0,081$) e seis ($p = 0,095$) dias revelou diferenças estatisticamente significativas. Embora preliminares para essa aplicação, verifica-se que o uso dessa ferramenta tem potencial para análise de envelhecimento de MP, no entanto são demandadas novas pesquisas para confirmar a tendência observada.

Destaca-se que a utilização de MEV para averiguação das modificações na superfície de MPs foi aplicada também pelos estudos de Li *et al.* (2022) e Li *et al.* (2024), nos quais foram identificadas quebras nas estruturas de MPs submetidas a 20 ou mais dias de irradiação UV. Após a decorrerência do período de envelhecimento, constatou-se que os MPs que antes apresentavam superfícies lisas e planas se tornaram ásperos e enrugados, e as partículas que inicialmente apresentavam medidas variáveis de 2-4 μm passaram a enquadrar-se como nanoplásticos. No atual estudo, não foi possível identificar alteração na morfologia dos MPs de forma visual, sem auxílio de métodos analíticos, podendo esse fato ser explicado pelo período de tempo de envelhecimento mais curto do que aqueles empregados nos estudos supracitados. Dessa maneira, é possível afirmar que, quanto maior o desprendimento de tempo no envelhecimento do MP, maiores serão a fragilização, a presença de rachaduras e a geração de radicais livres (ZHU *et al.*, 2020).

Análise por FTIR

A análise por FTIR possibilitou a identificação química das amostras de MP que passaram por diferentes intervalos

de envelhecimento. Os difratogramas dessas amostras são apresentados na Figura 4.

Os difratogramas das amostras de MP-PVC que passaram pelo processo de envelhecimento pela radiação UV-C mostraram que a oxidação do material começou com seis dias de irradiação e aumentou gradualmente. Isso é comprovado pelo aparecimento do pico de carbonila em 1716 cm^{-1} , pois, de acordo com Lin *et al.* (2020), os picos de absorção próximos a 1720 cm^{-1} se referem ao alongamento de grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$), e a formação de estruturas carbonílicas comprova a decomposição efetiva de ligações químicas do material pela exposição a radiação UV (HE *et al.*, 2023).

Nesta pesquisa, o comportamento da formação das estruturas carbonílicas foi verificado nos três estágios de envelhecimento do MP, no entanto mesmo o maior período de envelhecimento adotado (11 dias) descreve uma fase inicial de degradação com alta reatividade e oxidação do material, conforme evidenciado por Luo *et al.* (2023). Destaca-se que o comportamento do envelhecimento via radiação UV constatado nesta pesquisa se mostrou semelhante ao envelhecimento realizado por meio de plasma de descarga elétrica (Zhou *et al.*, 2020). Em ambos os processos, houve o aumento do índice de carbonila mesmo após a passagem de um curto período de tempo de envelhecimento.

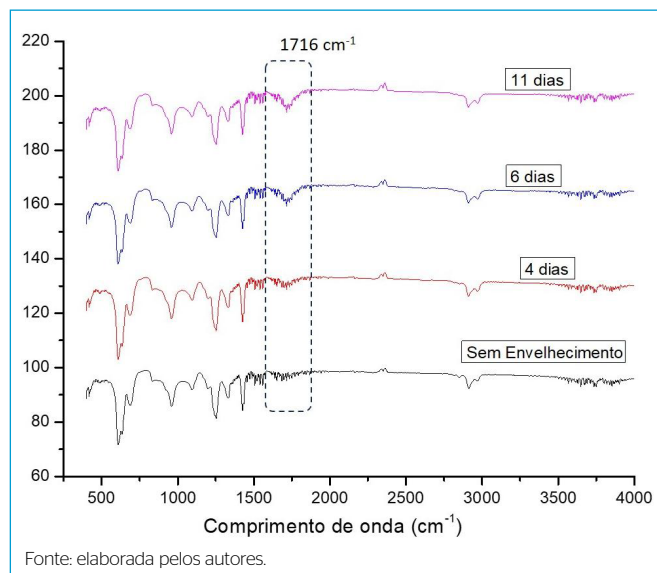


Figura 4 - Difratogramas de microplásticos de policloreto de vinila envelhecido em diferentes tempos de exposição

CONCLUSÕES

A combinação de técnicas utilizadas descritas pelo procedimento multianalítico quantitativo e a correlação entre elas permitem o monitoramento da progressão da degradação do MP. Evidenciou-se que a microscopia é um método visual qualitativo para contagem e avaliação da degradação do corante. Igualmente, o FTIR, importante para identificação da mudança na composição química dos MPs, e o MEV, juntamente com a análise da entropia da imagem, são primordiais para validação da mudança na textura do MP exposto ao fator de envelhecimento.

A exposição controlada à radiação UV-C, com potência instalada de 9 kWh/m² (dia), induziu a degradação acelerada do MP-PVC. A análise por MEV revelou alterações significativas na morfologia das partículas de PVC após 11 dias de exposição ao UV-C em condições controladas. A entropia da imagem, uma medida quantitativa da complexidade e heterogeneidade da superfície, demonstrou aumento progressivo com o tempo de exposição, indicando a formação de novas estruturas e a intensificação da degradação.

A FTIR corroborou os resultados da MEV, evidenciando alterações na estrutura química do PVC, como a oxidação e a formação de novos grupos funcionais. A combinação das técnicas de MEV e FTIR permitiu uma caracterização mais completa do processo de degradação, correlacionando as alterações morfológicas observadas pela MEV com as modificações químicas identificadas pela FTIR.

A entropia da imagem como ferramenta quantitativa para avaliar as alterações na textura das partículas de PVC demonstrou ser uma abordagem eficaz para monitorar o processo de envelhecimento. Os resultados obtidos neste estudo permitiram o desenvolvimento de uma metodologia semiautomática para a quantificação e caracterização

de amostras ambientais contendo MPs. Os resultados do teste paramétrico de Wilcoxon aplicados para entender a diferença na entropia das imagens adquiridas de cada um dos níveis de envelhecimento do MP indicaram diferenças estatisticamente significativas entre as imagens de 11 dias quando comparadas com as de seis e quatro dias, o que indica um envelhecimento mais potencializado desse período em diante. Embora preliminares para essa aplicação, verifica-se que o uso dessa ferramenta tem potencial para análise de envelhecimento de MP, no entanto são demandadas novas pesquisas para confirmar a tendência observada.

O estudo, apesar de fornecer avanços à temática emergente de identificação de MPs, apresenta lacunas na padronização das imagens adquiridas por microscopia óptica e na semiautomação para identificação dos MPs em amostras. Recomenda-se que em trabalhos futuros o tempo de envelhecimento das amostras seja ampliado, por meio do aumento do período de exposição ao UV-C, para que sejam analisadas novas correlações associadas ao comportamento de outros MPs (polipropileno, polietileno etc.), bem como seja confirmada a tendência das análises realizadas para entropia. Adicionalmente, sugere-se o monitoramento das alterações da estrutura molecular do plástico e seus efeitos na degradação do MP.

AGRADECIMENTOS

Rodrigo Moruzzi agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a bolsa de Produtividade em Pesquisa 309788/2021-8 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 2023/08052-1. Ana Clara Maccarini Colombo agradece a bolsa CNPq 120392/2023-2.

Rodrigo Moruzzi agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

REFERÊNCIAS

CHATTERJEE, S.; KROLIS, E.; MOLENAAR, R.; CLAESSENS, M.M.A.E.; BLUM, C. Nile Red staining for nanoplastic quantification: Overcoming the challenge of false positive counts due to fluorescent aggregates. *Environmental Challenges*, v. 13, 100744, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100744>

ENVI. *ENVI User's Guide-ENVI Version 4.7*. Nairóbi: ITT Visual Information Solutions, 2009.

ESPINOSA, R.; BAILÓN, R.; LAGUNA, P. Two-dimensional EspEn: A new approach to analyze image texture by irregularity. *Entropy*, v. 23, n. 10, p. 1261, 2021.

- GAO, Z.; CIZDZIEL, J.V.; CHEN, L. Microplastics profile in sludge from a university wastewater treatment plant and the influence of chemical digestions on Nile red stained microplastics. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 11, n. 3, 109671, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109671>
- GONZALEZ, R.C.; WOODS, R.E. *Digital image processing*. 2ª ed. Knoxville: Prentice Hall, 2002.
- GÓMEZ, C.A.P.; TORRES, M.; POZO, K.; BERRÍO D.E. Identificación de microplásticos en heces de lobos marinos (*Otaria flavescens*) en el puerto La Poza, Región del Bio bío, Chile. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, v. 35, n. 1, 2024. <https://doi.org/10.15381/rivep.v35i1.25593>
- HAN, X.; VOGT, R.D.; ZHOU, J.; ZHENG, B.; YU, X.; FENG, J.; LU, X. Increased Cu (II) adsorption onto UV-aged polyethylene, polypropylene, and polyethylene terephthalate microplastic particles in seawater. *Frontiers in Marine Science*, v. 8, 770606, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.770606>
- HARALICK, R.M.; SHANMUGAN, K.; DINSTEN, I.H. Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, n. 6, p. 610-621, 1973. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1973.4309314>
- HE, W.; LIU, S.; ZHANG, W.; YI, K.; ZHANG, C.; PANG, H.; HUANG, D.; HUANG, J.; LI, X. Recent advances on microplastic aging: Identification, mechanism, influence factors, and additives release. *Science of the Total Environment*, v. 889, 164035, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164035>
- HENGSTMANN, E.; FISCHER, E.K. Nile red staining in microplastic analysis—proposal for a reliable and fast identification approach for large microplastics. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 191, n. 10, p. 612, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7786-4>
- IVLEVA, N.P. Chemical analysis of microplastics and nanoplastics: challenges, advanced methods, and perspectives. *Chemical Reviews*, v. 121, n. 19, p. 11886-11936, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00178>
- KOELMANS, A.A.; HASSELERHARM, P.E.R.; NOR, N.H.M.; DE RUIJTER, V.N.; MINTENIG, S.M.; KOOI, M. Risk assessment of microplastic particles. *Nature Reviews Materials*, v. 7, n. 2, p. 138-152, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00411-y>
- LABBE, A.B.; BAGSHAW, C.R.; UTTAL, L. Inexpensive adaptations of basic microscopes for the identification of microplastic contamination using polarization and Nile Red fluorescence detection. *Journal of Chemical Education*, v. 97, n. 11, p. 4026-4032, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c00518>
- LI, F.; BAI, X.; JI, Y.; KANG, M. Understanding microplastic aging driven by photosensitization of algal extracellular polymeric substances. *Journal of Hazardous Materials*, v. 469, 133949, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133949>
- LI, Y.; ZHANG, Y.; SU, F.; WANG, Y.; PENG, L.; LIU, D. Adsorption behaviour of microplastics on the heavy metal Cr (VI) before and after ageing. *Chemosphere*, v. 302, 134865, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134865>
- LIN, J.; YAN, D.; FU, J.; CHEN, Y.; OU, H. Ultraviolet-C and vacuum ultraviolet inducing surface degradation of microplastics. *Water Research*, v. 186, 116360, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116360>
- LIU, P.; SHI, Y.; WU, X.; WANG, H.; HUANG, H.; GUO, X.; GAO, S. Review of the artificially-accelerated aging technology and ecological risk of microplastics. *Science of the Total Environment*, v. 768, 144969, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.144969>
- LU, Q.; ZHOU, Y.; SUI, Q.; ZHOU, Y. Mechanism and characterization of microplastic aging process: A review. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, v. 17, n. 8, p. 100, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11783-023-1700-6>
- LUO, H.; LIU, C.; HE, D.; SUN, J.; LI, J.; PAN, X. Effects of aging on environmental behavior of plastic additives: Migration, leaching, and ecotoxicity. *Science of the Total Environment*, v. 849, 157951, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157951>
- LUO, H.; TU, C.; HE, D.; ZHANG, A.; SUN, J.; LI, J.; XU, J.; PAN, X. Interactions between microplastics and contaminants: A review focusing on the effect of aging process. *Science of the Total Environment*, v. 899, p. 165615, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165615>
- MAZZONI, T.S.; FERNANDES, D.A.; SILVA, G.C.; PEREIRA, A.H.; SOUZA, M.F. Invisibilidade dos microplásticos: uma macro ameaça ao meio ambiente e à saúde humana. *Saneamento, Saúde e Ambiente*, v. 2, p. 82, 2024. <https://doi.org/10.36229/978-65-5866-386-7.CAP.06>
- MEYERS, N.; CATARINO, A.I.; DECLERCQ, A.M.; BRENNAN, A.; DEVRIESE, L.; VANDEGEHUCHTE, M.; DE WITTE, B.; JANSSEN, C.; EVERAERT, G. Microplastic detection and identification by Nile red staining: Towards a semi-automated, cost-and time-effective technique. *Science of the Total Environment*, v. 823, 153441, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153441>
- RUMIN, J.; BONNEFOND, H.; SAINT-JEAN, B.; ROUXEL, C.; SCIANDRA, A.; BERNARD, O.; CADORET, J.P.; BOUGARAN, G. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, p. 42, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0220-4>

- SHRUTI, V.C.; PÉREZ-GUEVARA, F.; ROY, P.D.; KUTRALAM-MUNIASAMY, G. Analyzing microplastics with Nile Red: Emerging trends, challenges, and prospects. *Journal of Hazardous Materials*, v. 423, parte B, 127171, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127171>
- TADSUWAN, K.; BABEL, S. Microplastic contamination in a conventional wastewater treatment plant in Thailand. *Waste Management & Research*, v. 39, n. 5, p. 754-761, 2021. <https://doi.org/10.1177/0734242X20982055>
- VASUDEVA, M.; WARRIER, A.K.; KARTHA, V.B.; UNNIKRISHNAN, V.K. Advances in microplastic characterization: spectroscopic techniques and heavy metal adsorption insights. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 183, 118111, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.118111>
- WOO, H.; SEO, K.; CHOI, Y.; KIM, J.; TANAKA, M.; LEE, K.; CHOI, J. Methods of analyzing microsized plastics in the environment. *Applied Sciences*, v. 11, n. 22, 10640, 2021. <https://doi.org/10.3390/app112210640>
- ZHANG, W.; WANG, Q.; CHEN, H. Challenges in characterization of nanoplastics in the environment. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, v. 16, p. 11, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11783-021-1445-z>
- ZHOU, L.; WANG, T.; QU, G.; JIA, H.; ZHU, L. Probing the aging processes and mechanisms of microplastic under simulated multiple actions generated by discharge plasma. *Journal of Hazardous Materials*, v. 398, 122956, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122956>
- ZHU, K.; JIA, H.; SUN, Y.; DAI, Y.; ZHANG, C.; GUO, X.; WANG, T.; ZHU, L. Long-term phototransformation of microplastics under simulated sunlight irradiation in aquatic environments: Roles of reactive oxygen species. *Water Research*, v. 173, 115564, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115564>
- ZURIER, H.S.; GODDARD, J.M. Biodegradation of microplastics in food and agriculture. *Current Opinion in Food Science*, v. 37, p. 37-44, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.09.001>