

APLICAÇÃO DA IRRADIAÇÃO CURTA NA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS DE AMOSTRAS DE MEXILHÃO

Daniele Seo^{1,2}, Mitiko Saiki¹, Marília G. M. Catharino¹, Edson G. Moreira¹
e Marina B. A. Vasconcellos¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)

Av. Professor Lineu Prestes 2242

05508-000 São Paulo, SP

danyseo@uol.com.br; mitiko@ipen.br; mgcatharino@ipen.br; emoreira@ipen.br; mbvascon@ipen.br

² Universidade Presbiteriana Mackenzie

Rua da Consolação 930

01302-907 São Paulo, SP

RESUMO

Análises de elementos traço em amostras de mexilhão apresentam grande interesse para o uso na monitoração da região costeira. Este trabalho apresenta os resultados preliminares da determinação dos elementos Br, Cl, K, Mg, Mn e Na obtidos nas amostras de mexilhão *Perna perna* por meio de irradiação curta da análise por ativação com nêutrons (NAA). Amostras de mexilhões coletadas na região costeira do litoral paulista foram limpas, trituradas, homogeneizadas e secas por meio da liofilização para posteriores análises. Alíquotas das amostras obtidas na forma de pó foram pesadas em invólucros de polietileno e irradiadas no reator nuclear IEA – R1 juntamente com padrões sintéticos de elementos. O tempo de irradiação foi de 10 min e sob fluxo de nêutrons térmicos de $9,6 \times 10^9 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As medições das atividades gama das amostras e dos padrões sintéticos foram feitas utilizando um detector de Ge hiperpuro ligado a um espectrômetro de raios gama. As concentrações dos elementos acima citados foram calculadas pelo método comparativo. Concentrações dos elementos Br e Mn foram obtidas aos níveis de mg kg^{-1} e de Cl, K, Mg e Na da ordem de percentagens foram determinadas nos mexilhões. Os resultados obtidos no material de referência NIST 1566b *Oyster Tissue* indicaram uma boa concordância com os valores certificados.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o aporte de substâncias tóxicas devido à poluição ambiental tem trazido grandes preocupações a nível global, principalmente nas regiões estuarinas que sofrem impacto de atividades agrícolas e industriais.

Os estuários, situados em regiões costeiras, freqüentemente encontram-se localizados em áreas de grande atividade antrópica, sendo, portanto, susceptíveis aos impactos decorrentes destas atividades. As principais fontes de impacto ambiental em estuários seriam o escoamento de esgoto proveniente de áreas urbanas, a liberação de diversos produtos químicos (orgânicos e inorgânicos) pela atividade industrial, a agricultura e o fluxo de embarcações, atividade a partir da qual podem ocorrer vazamentos acidentais de petróleo e derivados, combustíveis e outros produtos transportados por via marítima [1]. Neste contexto, um dos métodos que têm sido utilizados para determinação das concentrações dessas substâncias tóxicas em água do mar é a monitoração por meio de diferentes espécies de bivalves.

No que tange aos bivalves, estes representam um dos grupos de organismos aquáticos mais estudados em programas de biomonitoramento[2-7] e em estudos toxicológicos [8-11]. As vantagens mais evidentes da utilização destes organismos são a sua ampla distribuição geográfica, hábito sésil e habilidade de concentrar compostos químicos em até 10^2 - 10^5 vezes em relação às concentrações detectadas na água[12]. Neste sentido, os organismos vivos podem bioacumular metais, incorporando-os na cadeia trófica e atingindo grande parte dos diferentes estratos que constituem os ecossistemas aquáticos [13].

No Brasil, diversos trabalhos têm sido realizados visando o uso de organismos marinhos, como os mexilhões, como indicadores de metais tóxicos e organoclorados. Ênfase especial é dada à análise de mercúrio e metilmercúrio, devido à particular toxicidade dos compostos orgânicos desse elemento e às descargas industriais que ocorrem, particularmente das indústrias de cloro-álcalis [14].

No entanto, devido à extensão do país e aos inúmeros problemas ambientais que têm ocorrido devido aos aportes antrópicos de compostos tóxicos das mais diversas naturezas ao meio ambiente, torna-se necessária a obtenção ainda de um grande volume de dados com relação à monitoração de diversos compartimentos ambientais, como águas, solos, sedimentos, aerossóis, etc.

O presente trabalho apresenta os resultados preliminares obtidos na análise de mexilhões *Perna perna*, coletados no litoral paulista, pelo método de análise por ativação com nêutrons realizando irradiações curtas no reator nuclear.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Coleta e Tratamento das Amostras de Mexilhão *Perna perna*

As amostras de mexilhões *Perna perna* foram adquiridas em um cultivo situado na Praia da Cocanha em Caraguatatuba e foram transplantadas para vários pontos ao longo do litoral paulista, a saber: Pôr Sul da PETROBRÁS (TEBAR)-São Sebastião; Ilha das Palmas-Santos; Ponta de Itaipu-Santos; Praia do Engenho d'água-São Sebastião-Ilhabela. Estes locais foram escolhidos por serem pontos onde os organismos ficam sujeitos a situações de estresse devido à proximidade de aporte de efluentes industriais, efluentes municipais ou atividades ligadas à indústria do petróleo. Decorridos os 3 meses, ou seja, uma estação do ano, os mexilhões foram coletados para análise e nestes pontos foram realizados novos transplantes para monitoração do próximo período.

Na coleta das amostras de mexilhão *Perna perna* foram selecionados 90 mexilhões de tamanhos distintos para cada corda de cada ponto sendo 30 de tamanhos pequenos, 30 médios e 30 grandes. Em seguida, retiraram-se algas e outros organismos que ficam impregnados nas conchas dos mexilhões utilizando uma faca de lâmina de titânio. Após a remoção das cracas, lavou-se cada organismo com água do mar e mediu-se seu comprimento e largura da concha. Os tecidos dos mexilhões retirados das suas conchas foram triturados e homogeneizados em um liquidificador com lâminas de titânio. Ao término da homogeneização, estas amostras foram pesadas, armazenadas e congeladas para posterior secagem usando um liofilizador de marca Thermo Electron Corporation, modelo Modulyo D115, adequado para a secagem de

pequenas quantidades de amostras, por um período de 48 horas, à temperatura de -52°C e pressão de $74\ \mu\text{bar}$. As amostras secas foram depois moídas em almofariz de ágata e peneiradas em uma peneira de nylon de 100 mesh. Finalmente, as amostras na forma de pó foram armazenadas em frascos plásticos, etiquetadas e guardadas no freezer para posteriores análises. Na ocasião da pesagem destas amostras de mexilhão para análise foram novamente feitas as determinações de umidade, secando alíquota de cada amostra numa estufa por 24 horas a 85°C .

2.2. Análise de Material de Referência Certificado

Para avaliar a qualidade dos resultados analíticos, foi analisado o material de referência certificado NIST 1566b *Oyster Tissue* [15] procedente do National Institute of Standards and Technology U. S. A. Para expressar os resultados destas análises na base seca foi feita a determinação de perda de umidade, secando o material a 85°C por 24 horas. Nesta determinação, foi obtida uma porcentagem de perda de umidade de 3,73%.

2.3. Preparação dos Padrões Sintéticos de Elementos a Serem Analisados

Para a preparação dos padrões sintéticos de elementos a serem analisados, utilizaram-se soluções padrão de elementos certificados adquiridas da *Spex CertiPrep U.S.A.*, pipetador automático da marca *Eppendorf* e balões volumétricos previamente verificados quanto a sua calibração. A partir destas soluções padrão estoque, foram preparadas soluções mais diluídas contendo um ou mais elementos. Pipetou-se $50\ \mu\text{L}$ destas soluções padrão obtidas sobre tiras de papel-filtro *Whatman* N^o 40. As tiras de papel contendo alíquotas das soluções pipetadas foram colocadas no dessecador para a secagem à temperatura ambiente, tomando-se o cuidado para que não ocorresse contaminação. Posteriormente estas tiras foram dobradas e colocadas em invólucros de polietileno, os quais foram selados com ferro elétrico para solda. Os plásticos para a preparação dos invólucros eram previamente lavados com solução diluída de ácido nítrico p.a. e água purificada. As massas dos elementos nestes padrões sintéticos foram (em μg): Br = 5,0; Cl = 200; K = 500,8; Mg = 500,6; Mn = 3,99; Na = 99,98; V = 10,02.

2.4. Procedimento para Análise por Ativação com Nêutrons (NAA)

O procedimento para NAA consistiu em irradiar cerca de 180 mg de cada amostra de mexilhão e do material de referência pesados em invólucros de polietileno no reator IEA – R1 juntamente com os padrões sintéticos de elementos. As amostras de mexilhão, material de referência e os padrões sintéticos foram colocados em um invólucro de polietileno, o qual foi inserido em um dispositivo de polietileno, chamado de “coelho”, para irradiação por meio da Estação Pneumática n^o4, sob um fluxo de nêutrons térmicos de $9,6 \times 10^9\ \text{n cm}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ por um período de 10 min. As amostras e os padrões irradiados foram montados em suportes individuais de aço inoxidável (“panelinhas”), usando fita adesiva, para as medições. Após cerca de 5 min de decaimento as medições das atividades gama foram feitas utilizando um detector de Ge hiperpuro da marca Canberra ligado a um espectrômetro de raios gama e eletrônica associada. Estas medições foram executadas para dois diferentes tempos de decaimento. Posteriormente, os espectros foram processados usando o programa de computação VERSÃO2 e foram obtidas as taxas de contagens e os valores das energias dos raios gama de radioisótopos formados. Por meio das energias dos raios gama e meias vidas foram feitas as identificações dos radioisótopos formados. Conhecendo-se a meia-vida do

radioisótopo, tempos de decaimento, taxas de contagens e massa total da amostra e dos elementos presentes no padrão, foram calculadas as concentrações dos elementos presentes na amostra pelo método comparativo. Os radioisótopos utilizados foram ^{80}Br , ^{38}Cl , ^{42}K , ^{27}Mg , ^{56}Mn , ^{24}Na e ^{52}V .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão os resultados das concentrações de elementos obtidos na análise do material de referência NIST 1566b *Oyster Tissue*, juntamente com os valores do certificado.

Tabela 1. Concentrações de elementos no material de referência NIST 1566b *Oyster Tissue*

Elemento	Este trabalho			Valor do certificado [15]
	Concentração	s ^a (%)	ER ^b (%)	
Br, $\mu\text{g g}^{-1}$	56,0 ± 6,5	11,7	ND ^c	ND
Cl, $\mu\text{g g}^{-1}$	5124 ± 354	6,9	0,3	5140 ± 100
K, $\mu\text{g g}^{-1}$	6472 ± 628,2	9,7	0,7	6520 ± 90
Mg, $\mu\text{g g}^{-1}$	1197 ± 246	20,6	10,3	1085 ± 23
Mn, $\mu\text{g g}^{-1}$	19,7 ± 1,0	5,2	6,3	18,5 ± 0,2
Na, $\mu\text{g g}^{-1}$	2848 ± 146,7	5,2	13,6	3297 ± 53

^a Incerteza (Refere-se à estatística de contagem de uma determinação); ^b Erro relativo; ^c Não detectado.

A comparação dos resultados obtidos com os valores do certificado indica uma boa concordância, mostrando que o método é válido para a análise dos elementos. Os erros relativos percentuais obtidos foram inferiores a 13,6%. A incerteza da determinação obtida foi inferior a 11,7% com exceção do Mg. O alto valor de incerteza obtido para Mg se deve provavelmente às baixas taxas de contagens obtidas para o pico 1014,4 do ^{27}Mg e também devido ao problema de interferência do ^{56}Mn que possui um pico de 846,8 keV bastante próximo de 843,8 keV do ^{27}Mg .

Na Tabela 2, estão os resultados preliminares obtidos na determinação de Br, Cl, K, Mg, Mn e Na nas amostras de mexilhão *Perna perna*. Os elementos Cl, K, Mg, e Na foram obtidos ao nível de percentagens e o Br e Mn da ordem de mg kg^{-1} . O elemento V foi detectado em duas amostras, procedentes do TEBAR e da Ponta de Itaipu. Um dos problemas na detecção do V foi a alta atividade do ^{38}Cl e ^{24}Na formados na ativação das amostras do mexilhão. Condições adequadas de irradiação deverão ser estabelecidas para a determinação do vanádio. A determinação de vanádio nestas amostras apresenta interesse uma vez que a presença deste elemento nos mexilhões poderá indicar a sua possível origem das atividades petrolíferas.

4. CONCLUSÕES

O método de análise por ativação com nêutrons mostrou-se eficaz na determinação dos elementos Br, Cl, K, Mg, Mn e Na nas amostras de mexilhão *Perna perna*. A concordância dos resultados obtidos com os valores do material de referência foi satisfatória. Os resultados

obtidos permitiram concluir que os mexilhões apresentam teores de elementos como K, Mg e Mn importantes sob o ponto de vista nutricional.

Tabela 2. Concentrações de elementos nas amostras de mexilhão na base seca

Locais de coleta/ Período	Br (mg kg ⁻¹)	Cl (%)	K (%)	Mg (%)	Mn (mg kg ⁻¹)	Na (%)
^a CC/ ^b Pri	301 ± 16 ^j	9,3 ± 0,3	1,13 ± 0,05	0,39 ± 0,04	7,2 ± 0,6	3,72±0,03
CC/ ^c Ver	300 ± 16	9,3 ± 0,4	1,17 ± 0,02	0,42 ± 0,04	18,1 ± 0,8	3,93±0,03
CC/ ^d Out	227 ± 31	6,3 ± 0,6	0,78 ± 0,16	0,44 ± 0,08	8,2 ± 1,4	4,34±0,10
CC/ ^e Inv	219 ± 29	5,7 ± 0,5	1,10 ± 0,15	0,42 ± 0,05	8,1 ± 1,3	3,15±0,07
^f IT/ Pri	283 ± 30	8,3 ± 0,4	1,17 ± 0,04	0,37 ± 0,03	32,6 ± 1,3	2,05±0,02
^g IP/ Pri	264 ± 13	11,1 ± 0,6	1,09 ± 0,11	0,36 ± 0,04	31,7 ± 0,8	2,71±0,02
IP/ Out	339 ± 19	10,3 ± 0,4	1,35 ± 0,08	0,36 ± 0,06	11,0 ± 0,7	3,98±0,04
^h IB/ Pri	238 ± 13	7,9 ± 0,4	0,84 ± 0,04	0,31 ± 0,03	11,0 ± 0,7	3,00±0,02
IB/ Ver	337 ± 17	8,4 ± 0,3	0,81 ± 0,14	0,48 ± 0,04	12,7 ± 0,7	4,77±0,08
IB/ Out	361 ± 60	9,9 ± 1,0	1,27 ± 0,11	0,76 ± 0,11	18,3 ± 1,0	4,77±0,08
IB/ Inv	418 ± 70	11,5 ± 1,1	1,11 ± 0,11	0,674±0,12	9,3 ± 1,0	5,37±0,09
ⁱ TB/ Pri	326 ± 17	11,5 ± 0,4	1,30 ± 0,10	0,48 ± 0,04	8,8 ± 0,6	3,40±0,04
TB/Ver	258 ± 91	9,12 ± 0,4	0,85 ± 0,14	0,50 ± 0,06	13,8 ± 0,8	5,11±0,09

^a Praia da Cocanha; ^b Primavera; ^c Verão; ^d Outono; ^e Inverno; ^f Ponta de Itaipu; ^g Ilha das Palmas; ^h Ilhabela; ⁱTEBAR; ^jResultado de uma determinação. A incerteza foi avaliada considerando erros nas medições das atividades da amostra e padrão.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro concedido em projetos de pesquisa e pela bolsa PIBIC/CNPq.

REFERÊNCIAS

1. M.J. Kennish, *Ecology of estuaries: anthropogenic effects*, Boca Raton: CRC Press. (1991).
2. A. Viarengo, L. Canesi, "Mussels as biological indicators of pollution", *Aquaculture*, **94**, pp.225-243 (1991).
3. C.A.R. Silva, P.S. Rainbow, B.D. Smith, Z.L. Santos, "Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source", *Water Research*, **35**, pp.4072-4078 (2001).
4. S.R.C. Alves, P.C. Severino, D.P. Ibbotsom, A.Z.X. Silva, F.R.A.S. Lopes, L.A. Sáenz, A.C.D. Bairy, "Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove

- oyster *Crassostrea rhizophorae*”, *Marine Environmental Research*, **54**, pp.241-245 (2002).
5. M.G. Lionetto, R. Caricato, M.E. Giordano, M.F. Pascariello, L. Marinosci, T. Schettino, “Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytillus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area”, *Marine Pollution Bulletin*, **46**, pp.324-330 (2003).
 6. F. Ricciardi, A. Binelli, A. “Provinmi, Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy)”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **63**, pp.406-412 (2006).
 7. J. Zanette, J.M. Monserra, T. Bianchini, A. “Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **143 C**, pp.187-195 (2006).
 8. J.M. Monserrat, A. Bianchini, A.C.D. Bainy, “Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species”, *Marine Environmental Research*, **54**, pp.781-785 (2002).
 9. P. Valbonesi, G. Sartor, R. Fabbri, “Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes”, *The Science of Total Environment*, **312**, pp.79-88 (2003).
 10. I. Corsi, M. Mariottini, C. Sensini, L. Lancini, S. Focardi, “Fish as biomarkers of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations”, *Oceanologica Acta*, **26**, pp.129-138 (2003).
 11. A. Binelli, F. Ricciardi, C. Riva, A. Provini, “New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)”, *Chemosphere*, **62**, pp.510-519 (2006).
 12. I. Sunila, “Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea)”, *Annales Zoologica Fennici*, **24**, pp.55-69 (1987).
 13. A. Viarengo, “Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level”, *Reviews in Aquatic Sciences*, **1**, pp.295 (1989).
 14. I.D. Medeiros; E.A. Almeida; E.C. Ventura; I.C. Muller; M.P. Mezzari; A. C.D. Bainy, “Biomonitoramento da contaminação aquática na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina utilizando mexilhões *Perna perna* como organismos sentinela”, *Anais do 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia*, Itajaí, SC, 05 a 08 de outubro de 1998, CD ROM, pp.51 (1998).
 15. National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Material 1566b Oyster Tissue, *Certificate from National Institute of Standards and Technology*, U. S. A., 17 de Janeiro de 2001, pp.1-8 (2001).