

# PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE LIQUENS PARA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS

Larissa R. Aguiar<sup>1,2</sup>, Edson R. Alves<sup>1</sup> e Mitiko Saiki<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP)  
Av. Professor Lineu Prestes 2242  
05508-000 São Paulo, SP  
lraguiar@ipen.br  
eralves@ipen.br  
mitiko@ipen.br

<sup>2</sup> Faculdades Oswaldo Cruz  
Rua Brigadeiro Gavião 540  
01151-000 São Paulo, SP

## RESUMO

Este trabalho apresenta sobre os procedimentos estabelecidos para coleta e preparação das amostras de líquens para determinação de elementos químicos pelo método de Análise por Ativação com Nêutrons (NAA). Trata-se de um estudo de grande interesse uma vez que os líquens são amplamente analisados para monitoração da poluição aérea. Este procedimento consistiu em coletar líquens dos troncos das árvores usando uma faca de titânio e armazená-los em sacos de papel para posterior identificação da espécie. Para as análises, estas amostras foram limpas e lavadas com água purificada. Em seguida, elas foram liofilizadas e moídas em um micromoinho. Para verificar a homogeneidade da amostra preparada, foram realizadas análises em replicata. Nos líquens, as concentrações de Ba, Br, Cr, Fe, K, Na, Rb e Zn foram obtidas em níveis de  $\text{mg kg}^{-1}$ , os elementos As, Co, Cs, La, Sb, Sc e Se em níveis de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e o Ca em níveis de percentagens. Os resultados das análises em replicata indicaram uma boa reprodutibilidade. O material de referência IAEA 336 Lichen foi analisado para o controle de qualidade dos resultados analíticos.

## 1. INTRODUÇÃO

O principal requisito para a confiabilidade de qualquer resultado analítico é a qualidade da amostra e dos procedimentos analíticos empregados [1,2]. Os processos de coleta e de preparação de amostras são etapas importantes na seqüência de uma análise uma vez que a matriz deve permanecer intacta em termos dos seus elementos traço.

Relativamente aos trabalhos sobre garantia e controle de qualidade na coleta e estocagem de amostras ambientais tem se o trabalho de Wagner [3] que descreve as recomendações para evitar possíveis erros nas análises. Ward [4] também salienta sobre o problema da contaminação e perdas de elementos durante a amostragem, estocagem e preparação de amostras e chama atenção da necessidade de estabelecer protocolos internacionais para execução destas etapas para possibilitar a comparação de dados obtidos em diferentes laboratórios com alto grau de confiabilidade.

O objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade dos resultados obtidos com relação a exatidão e precisão na análise por ativação com nêutrons (NAA) de líquens bem como fazer uma avaliação da homogeneidade da amostra de líquen com relação aos teores de elementos químicos.

O estabelecimento de protocolos apropriados para análise de líquens tem sido de grande interesse uma vez que este tipo de matriz vem sendo amplamente utilizada na biomonitoração da poluição área conforme os diversos trabalhos publicados [5-9].

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Coleta de Amostras de Líquens**

Para o presente estudo foi escolhido o fungo liquenizado da espécie *Canoparmelia texana* (Tuck) Elix & Hale, que é um líquen epífito, folioso da família *Parmeliaceae*. Este biomonitor é encontrado em larga extensão em todas as cidades do território brasileiro exceto em cidades costeiras [10]. A amostragem desta espécie foi feita em dois pontos da área do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) localizado dentro do Campus da Universidade de São Paulo, SP. O procedimento para a coleta consistiu em remover cuidadosamente os líquens dos troncos das árvores com o auxílio de uma faca de titânio a uma altura de aproximadamente 1,50 m do solo e estas amostras foram armazenadas em sacos de papel para posterior identificação da espécie pelo taxologista. Foi também verificado que o uso de sacos de plástico para armazenamento de líquens não é conveniente devido a formação de bolores nas amostras. A faca utilizada foi de material titânio de alta pureza para evitar a contaminação das amostras.

### **2.2. Tratamento das Amostras para Análise**

Para obter-se a amostra de líquen na forma apropriada para análise, as etapas de sua preparação foram realizadas em um laboratório limpo. Para retirar a casca da árvore aderida ao líquen, utilizou-se uma pinça de tamanho médio, um par de tesouras, frascos e espátulas de polietileno e outros utensílios pertencentes a um kit ortodôntico. Após esta etapa, foi realizada uma limpeza minuciosa examinando a amostra com o auxílio de um microscópio estereoscópico modelo 4060 da marca Olympus para remover os materiais estranhos e substratos da casca de árvore presente nos líquens. A seguir, as amostras ficaram imersas em água purificada Milli-Q por aproximadamente 3 minutos. A imersão da amostra por longos períodos evita o problema de desorção dos elementos acumulados nos líquens. A secagem da amostra foi realizada por cerca de 16 horas usando um liofilizador da marca Micro Modulyo da Edwards com uma pressão de  $6,0 \times 10^{-2}$  mbar. A amostra seca foi triturada em um micromoinho da marca Pulverisette "O" da Fritsch obtendo-se na forma de pó o qual foi guardado em um frasco de polietileno dentro de um dessecador para evitar a absorção de umidade.

### **2.3. Preparo de Padrões Sintéticos de Elementos**

Para a preparação dos padrões sintéticos dos elementos para a análise de líquens foram utilizadas soluções padrão certificadas da Spex Certiprep EUA dos seguintes elementos: As, Ba, Br, Ca, Co, Cr, Cs, K, Fe, La, Na, Rb, Sb, Sc, Se e Zn. A partir destas soluções padrão estoques foram preparadas soluções padrão mais diluídas simples e multielementares.

Alíquotas de 50 µL destas soluções foram pipetadas sobre tiras de papel de filtro da marca Whatman nº 40. O pipetador automático utilizado foi verificado quanto à sua calibração. As tiras de papel foram colocadas em um dessecador por aproximadamente 24 h para a secagem das soluções pipetadas. Estas tiras secas foram dobradas com auxílio de pinças e acondicionadas em envelopes de polietileno. Estes envelopes de polietileno contendo tiras de papel foram selados usando solda elétrica. As quantidades dos elementos nestes padrões sintéticos, em µg, foram as seguintes: As = 1,5; Ba = 499,4; Br = 5,0; Ca = 500,1; Co = 0,2; Cr = 2,0; Cs = 0,6; K = 601,6; Fe = 350,0; La = 0,6; Na = 99,9; Rb = 9,99; Sb = 0,6; Sc = 0,08 e Zn = 35,0.

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

Os elementos presentes nos líquens foram determinados pelo método de Análise por Ativação com Nêutrons. Para isso cerca de 150 mg de líquen pesados em invólucros de polietileno e os padrões sintéticos foram embalados em folha de alumínio e colocados dentro de um dispositivo de alumínio, denominado “coelho”. Este dispositivo, contendo amostras e padrões, foi submetido a uma irradiação longa no reator de pesquisa IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP sob fluxo de nêutrons térmicos da ordem de  $6,0 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e por um período de 16 horas. As amostras e os padrões sintéticos irradiados foram medidos usando um detector de Ge hiperpuro ligado a um espectrômetro de raios gama e um sistema eletrônico associado. Para a aquisição dos dados foi utilizado o programa MAESTRO da EG & G Ortec e os espectros gama obtidos foram processados usando o programa VISPECT2. A identificação dos radioisótopos foi feita por meio das energias de raios gama e meias-vidas e as concentrações dos elementos foram determinadas pelo método comparativo.

#### **2.5. Análise do Material Certificado de Referência**

Para assegurar a qualidade dos resultados analíticos com relação a precisão e exatidão foi analisado o material certificado de referência IAEA-336 Lichen proveniente da Agência Internacional de Energia Atômica, Áustria. As condições experimentais utilizadas para suas análises foram as mesmas aplicadas às amostras de líquens. Para expressar os resultados do material de referência na sua base seca foi feita a determinação da percentagem de perda de umidade na secagem à temperatura de 85 °C por 24 h. O valor da percentagem de perda de peso obtido foi de 9,03% e este valor foi utilizado no cálculo da massa de material na base seca.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Sobre a amostragem da espécie *C. texana* convém salientar que se trata de um líquen bastante abundante no território brasileiro, ideal para uso na biomonitoração. No caso, esta espécie cresce cobrindo os troncos de árvores e rochas. Para monitoração da poluição aérea, o uso de líquens coletados de troncos de árvores é mais adequado devido a sua maior ocorrência neste tipo de substrato e menor influência do acúmulo de elementos do solo. Saiki *et al* [10] verificaram que a cascas de árvores praticamente não interferem nos teores de elementos dos líquens uma vez que este substrato apresenta concentrações de elementos muito baixas ou da mesma ordem de grandeza dos líquens.

Coccaro *et al* [11] verificaram que o acúmulo de elementos nos líquens aumenta com a idade da amostra ou do tempo de exposição. Portanto, na etapa de amostragem da espécie *C. texana* que apresenta um crescimento radial é importante que sejam coletadas amostras de mesma idade ou do mesmo tamanho quando se deseja realizar o biomonitoramento da poluição aérea.

No presente trabalho foi adotado o procedimento de lavagens dos líquens com água purificada baseado no trabalho anterior [8] em que foi mostrado que o procedimento de lavagem pode ser usado para retirar os materiais aderentes e muitos dos elementos de interesse sob o ponto de vista da contaminação ambiental não são removidos pela lavagem.

Os resultados das médias das concentrações de elementos obtidos para o material certificado de referência IAEA 336 Lichen, são apresentados na Tabela 1 juntamente com os valores do certificado. Estes resultados mostram uma boa concordância com os valores do certificado para a maioria dos elementos analisados. Foram obtidas percentagens de erros relativos inferiores a 7,2 % com exceção dos resultados obtidos para os elementos Ba e Cs. Com relação a precisão, os resultados obtidos apresentaram uma boa reprodutibilidade com desvios padrão relativos variando de 0,5 a 8,0 %.

**Tabela 1. Média das concentrações de elementos no material de referência IAEA 336 Lichen**

Elemento	Este trabalho			Valor do certificado [12]
	Média $\pm$ DP <sup>a</sup>	DPR (%) <sup>b</sup>	Er (%) <sup>c</sup>	
As ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	607 $\pm$ 31	5,1	3,7	630(550-710) <sup>d</sup>
Ba ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	7,5 $\pm$ 0,6	8,0	17,2	6,4(5,3-7,5) <sup>d</sup>
Br ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	13033 $\pm$ 363	2,8	1,0	12900(11200-14600) <sup>d</sup>
Ca (%)	0,24 $\pm$ 0,01	4,2		
Co ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	279,3 $\pm$ 11,8	4,2	3,7	290(240-340) <sup>d</sup>
Cr ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1105 $\pm$ 51	4,6		1060(890-1230) <sup>e</sup>
Cs ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	126,1 $\pm$ 3,0	2,4	14,6	110(97-123) <sup>d</sup>
Fe ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	408,4 $\pm$ 21,2	5,2	5,0	430(380-480) <sup>d</sup>
K ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	1812,4 $\pm$ 92,1	5,1	1,5	1840(1640-2040) <sup>d</sup>
La ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	630,3 $\pm$ 3,2	0,5	4,5	660(560-760) <sup>d</sup>
Na ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	317 $\pm$ 12	3,8	0,9	320(280-360) <sup>d</sup>
Rb ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	1,82 $\pm$ 0,05	2,7		1,76(1,54-1,98) <sup>e</sup>
Sb ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	76,83 $\pm$ 2,42	3,1	5,2	73(63-83) <sup>d</sup>
Sc ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	170,3 $\pm$ 10,5	6,2		170(150-190) <sup>e</sup>
Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	32,6 $\pm$ 1,3	4,0	7,2	30,4(27,0-33,8) <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Média aritmética e Desvio padrão de quatro determinações; <sup>b</sup> Desvio padrão relativo; <sup>c</sup> Erro relativo percentual; <sup>d</sup> Valores recomendados; <sup>e</sup> Valores informativos.

Na Tabela 2 são apresentados as médias das concentrações dos elementos com seus respectivos desvios padrão e desvios padrão relativos obtidos para duas amostras de *C.*

*texana*. Estes resultados mostram uma boa reprodutibilidade com desvios padrão relativos variando de 0,3 a 9,0 %. Estes resultados indicam que não houve variação significativa entre as concentrações dos elementos obtidos nas diferentes alíquotas, demonstrando uma boa homogeneidade com relação aos elementos determinados neste trabalho.

**Tabela 2. Média das concentrações de elementos obtidos nos líquens**

Elemento	Amostra 1		Amostra 2	
	Média ± DP <sup>a</sup>	DPR (%) <sup>b</sup>	Média ± DP <sup>a</sup>	DPR (%) <sup>b</sup>
As (µg kg <sup>-1</sup> )	305,6 ± 27,5	9,0	377,4 ± 26,1	6,9
Ba (mg kg <sup>-1</sup> )	101,3 ± 3,0	3,0	37,7 ± 1,7	4,5
Br (µg kg <sup>-1</sup> )	5316 ± 158	3,0	15004 ± 272	1,8
Ca (%)	4,5 ± 0,2	4,4	7,5 ± 0,1	1,3
Co (µg kg <sup>-1</sup> )	531,1 ± 6,0	1,1	551,2 ± 8,1	1,5
Cr (µg kg <sup>-1</sup> )	3579,4 ± 33,9	0,9	6157,1 ± 50,4	0,8
Cs (µg kg <sup>-1</sup> )	465,2 ± 4,7	1,0	472,1 ± 5,7	1,2
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	1194,1 ± 52,9	4,4	1545,3 ± 21,9	1,4
K (mg kg <sup>-1</sup> )	3292,4 ± 18,3	0,6	2818,8 ± 12,5	0,4
La (µg kg <sup>-1</sup> )	2283,1 ± 61,6	2,7	2354,4 ± 8,5	0,4
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	141,2 ± 0,5	0,4	210,6 ± 0,7	0,3
Rb (mg kg <sup>-1</sup> )	17,8 ± 0,8	4,5	18,9 ± 0,1	0,5
Sb (µg kg <sup>-1</sup> )	419,7 ± 28,7	6,8	496,7 ± 16,8	3,4
Sc (µg kg <sup>-1</sup> )	276,9 ± 1,1	0,4	345,6 ± 1,2	0,3
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	79,3 ± 4,4	5,5	87,4 ± 7,3	8,4

<sup>a</sup>Média aritmética e Desvio padrão de três determinações; <sup>b</sup> Desvio padrão relativo.

#### 4. CONCLUSÕES

Os valores obtidos para o material certificado de referência indicaram a viabilidade de aplicar o método de ativação com nêutrons na análise de líquens devido a boa exatidão e precisão dos seus resultados. Os valores obtidos para as amostras de líquens mostraram que o procedimento adotado neste trabalho foi adequado indicando a homogeneidade das amostras com relação aos elementos determinados neste estudo.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

1. B. Kratochvil, J. K. Taylor, "Sampling for chemical analysis", *Anal. Chem.*, **53**, pp.924-938 (1981).
2. G. V. Iyengar, "Presampling factors", *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, **91**, pp. 67-73 (1986).

3. G. Wagner, "Basic approaches and methods for quality assurance and quality control in sample collection and storage for environmental monitoring", *Sci. Total Environ.*, **176**, pp. 63-71 (1995).
4. N. I. Ward, "Environmental sampling – The first important area of measuring heavy metals in the environment" *Proceedings of International Conference Heavy Metals in the Environment*, Hamburg, September 1995, Vol. 2, pp. 281-284 (1995).
5. M. Bruin, "Applying biological monitors and neutron activation analysis in studies of heavy-metal air pollution", *IAEA Bulletin*, **4**, pp.22-27 (1990).
6. A. Aslan, G. Budak, A. Karabulut, "The amounts Fe, Ba, Sr, K, Ca e Ti in some lichens growing in Erzurum province (Turkey)", *J. Quant. Spectros. Radiat. Transfer*, **88**, pp. 423-431 (2004).
7. P. L. Nimis, S. Andreussi, E. Pittao, "The performance of two lichens species as biaccumulators of trace metals", *Sci. Total Environ.*, **275**, pp.43-51 (2001).
8. M. Saiki, C. G. Chaparro, M. B. A. Vasconcellos, M. P. Marcelli "Determination of trace elements in lichens by instrumental neutron activation analysis", *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **217**, pp.111-115 (1997).
9. M. Saiki, A. Fuga, E. R. Alves, M.B.A. Vasconcellos, M. P. Marcelli, "Biomonitoring of the atmospheric pollution using lichens in the metropolitan area of São Paulo city, Brazil", *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **271**, pp. 213-219 (2007).
10. M. Saiki, L. K. Horimoto, M. B. A. Vasconcellos, M. P. Marcelli, "Substrate influence on elemental composition of *Canoparmelia texana* lichenized fungi", *Proceedings of International Workshop*, Azores Island, Portugal, August 28- September 3, Vol. 1, pp 271-277 (2003).
11. D. M. B. Coccaro, M. Saiki, M. B. A. Vasconcellos, M. P. Marcelli, "Analysis of *Canoparmelia texana* lichens collected in Brazil by neutron activation analysis", *Proceedings of International Workshop*, Lisbon, Portugal, September 21-24, 1997, IAEA-TECDOC-1152, Vol. 1, pp 143-148 (2000).
12. International Atomic Energy Agency. Analytical quality control services. Reference material IAEA -336 Trace and minor elements in lichen, Vienna, 1999.