

Análise de Metais em Sangue de Bovinos e no Ambiente de Criação de Bovinos por XRF

Metal Analysis in Bovine Blood and in the Environment of Bovine Creation by XRF

Fábio Luiz Melquiades

Departamento de Física

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava, PR

fmelquiades@unicentro.br

Eduardo de Almeida

Centro de Engenharia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, São Paulo, SP

edualm@usp.br

Jayme Augusto Peres

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava, PR

perespatologia@hotmail.com

Basílio Smuczek

Departamento de Ciências Biológicas

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava, PR

basiliosmuczek@hotmail.com

Luana Cristina Wouk

Departamento de Física

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava, PR

luanawouk@yahoo.com.br

Resumo: O objetivo do estudo foi identificar a presença de elementos químicos em sangue de bovinos e no ambiente ao redor das propriedades rurais em que esses animais se encontravam, localizadas na Bacia do Rio das Pedras, na Serra da Esperança, município de Guarapuava, PR. A técnica analítica empregada foi a Fluorescência

Recebido em 28/06/2011 - Aceito em 22/08/2011.

RECEN Guarapuava, Paraná v. 13 n° 1 p. 9-21 jan/jun 2011

de Raios X por Dispersão em Energia (EDXRF) com equipamento portátil para as amostras ambientais e, no caso das amostras de sangue, a técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF). Foram coletadas e analisadas amostras de sangue, água, capim, sedimento e ração de três pequenas propriedades rurais. Apenas Fe foi quantificado na água apontando um local de contaminação. K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Rb, Zr e Pb foram encontrados no capim. K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Rb, Sr, Y, Zr, Pb foram identificados no sedimento e em uma das amostras de ração foi encontrado Pb. Nenhuma amostra de sangue apresentou excesso na concentração desses metais.

Palavras-chave: áreas rurais; bovinos; metal; XRF.

Abstract: The purpose of this study was to verify the presence of chemical elements in bovine blood and in the environment, from rural areas of bovine creation in the Rio das Pedras area, at Serra da Esperança, municipal district of Guarapuava – Paraná. The analytical technique employed was Energy Dispersive X-ray Fluorescence (EDXRF) with a portable equipment for the environmental samples, and in the case of blood samples, Total Reflection X-ray Fluorescence (TXRF). Blood, water, grass, sediment and feed samples were collected from three small rural properties. Only Fe was quantified in the water indicating one point of contamination. K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Rb, Zr and Pb on grass samples. K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Rb, Sr, Y, Zr, Pb were identified on sediment samples and in one feed sample it was found Pb. No blood sample showed excessive concentration of these metals.

Key words: bovine; EDXRF; metal; rural areas.

1 Introdução

Metais pesados, macro e micro elementos são constituintes naturais do meio ambiente. A concentração considerada tolerável foi superada pela ação antropogênica em diversos locais. Várias são as fontes desses elementos que podem contaminar o solo, a água e as plantas e, por conseguinte, os animais e o próprio homem [1, 2],

dentre as quais se destacam a deposição atmosférica, os resíduos agropecuários, os fertilizantes e os corretivos, os agroquímicos, os lodos de esgoto, a água de irrigação, os compostos de lixo urbano e os resíduos urbanos, industriais e de mineração [3]. Estes elementos químicos nocivos podem ser veiculados para os animais que utilizam os recursos naturais para alimentarem-se e em consequência afetar a saúde humana.

Embora o tema relacionado à contaminação por metais pesados em vários animais seja largamente abordado pela literatura científica, em bovinos, este estudo ainda é limitado. Além disso, também são frequentes os trabalhos que relacionam os efeitos desses elementos químicos sobre a saúde humana ou sobre algum compartimento ambiental específico, como é o caso do solo, dos sedimentos, da vegetação ou da água [3]. Obviamente, quando esses compartimentos estão contaminados, existe a possibilidade de aumento nos níveis desses elementos nos organismos animais comprometendo, dessa forma, a saúde e o bem estar do homem. Outra possível fonte de contaminantes em animais são os suplementos minerais, quando para a formulação desses suplementos, utiliza-se matéria prima oriunda de fontes inapropriadas comprometendo assim o equilíbrio dos elementos na sua formulação [4].

Indicadores ambientais ou bioindicadores são definidos como organismos que fornecem informações quantitativas ou qualitativas sobre a situação do ambiente ao redor. Por isso, um bom bioindicador indicará a presença de um elemento químico ou não que, excedendo o limite tolerável, comprometa a saúde animal e possivelmente a humana. Os bovinos podem ser utilizados como bioindicadores por permanecerem em contato direto com o solo, água e vegetação, onde se encontram os elementos que se deseja estudar [5].

A proximidade de convivência e a similaridade em termos fisiológicos com o ser humano, além da coincidência de *habitats* de vida, fazem com que animais como os bovinos apresentem potencial para serem utilizados como indicadores de contaminação ambiental [3].

O objetivo do trabalho foi identificar a presença de elementos químicos (análise de traços) em sangue de bovinos e no ambiente ao redor das propriedades rurais em que esses animais se encontravam, fazendo uso da técnica de Fluorescência de Raios X. Foram analisadas amostras de sangue por Fluorescência de Raios X por

Reflexão Total (TXRF) e amostras de água, solo, capim, suplemento mineral e sal com Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia (EDXRF).

A Fluorescência de Raios X (XRF) é uma técnica que permite a análise e o monitoramento de diversos tipos de amostras, dentre elas, amostras ambientais, pois é uma técnica analítica já estabelecida e bem desenvolvida. Em caráter específico, o uso da EDXRF tem crescido nos últimos 20 anos, no que diz respeito a esse tipo de análise [6, 7]. Tanto a EDXRF como a TXRF permitem uma análise multielementar qualitativa e/ou quantitativa e não destrutiva. Embora possua sensibilidade inferior a de outras técnicas analíticas para análises de metais, tais como: ICP-MS e AAS, a metodologia de XRF tem a vantagem de não necessitar de preparação de amostra, ou exigir poucos passos para o seu preparo prévio e, quando comparada às técnicas mencionadas, possui um custo menor por análise. Um dos principais benefícios no uso dessa técnica é o seu caráter não destrutivo, o que possibilita a análise das amostras por outras técnicas quando houver interesse e/ou necessidade.

2 Métodos e materiais

Os pontos de amostragem são localizados na bacia hidrográfica no Rio das Pedras, onde, de acordo com Battistelli[8], existem focos pontuais de poluição das águas, incluindo óleos e graxas em sua constituição. O solo que circunda pequenos corpos de água e seus afluentes são pouco desenvolvidos e a vegetação não é mais remanescente de floresta Araucária.

2.1 Amostras de sangue

O sangue foi coletado de animais clinicamente saudáveis, comprovados por exame semiológico prévio, bem como, nos animais presentes na localidade por um período superior a 5 anos. No caso das fêmeas, coletou-se somente na ausência de gestação. Treze animais, de 5 propriedades diferentes foram usados no estudo.

Coletou-se 5mL de sangue por venopunção após a contenção do animal e a antissepsia com Iodo Povidine[®] embebido em algodão na região cervical lateral punccionando a veia jugular utilizando agulha descartável siliconada[®] na espessura de

40x12 mm. A agulha foi ligada em adaptador de polietileno ao tubo de vacutainer[®], de mesma composição com tampa azul, específica para análise de metais pesados. O tubo foi identificado e armazenado sob refrigeração para posterior análise.

Amostras de sangue coagulado na fração líquida foram analisadas por TXRF no LIN-CENA/USP. Foram preparados padrões monoelementares de K, Ca, Fe e Zn para obtenção das curvas de calibração. O material de referência IAEA-A-13 foi analisado para certificação dessas curvas. Tanto nas amostras como nos padrões foram adicionadas alíquotas contendo o elemento Galio (Ga) como padrão interno (proveniente da solução estoque Ga 10 mg L⁻¹). As amostras foram analisadas em suportes de lucite para a determinação de Fe e em suportes de quartzo para a determinação de K, Ca e Zn. Pipetaram-se 20 microlitros da amostra/padrão sobre o suporte de lucite e 10 microlitros no suporte de quartzo, seguido de secagem em estufa (60 °C).

As medidas de TXRF foram realizadas no LIN-CENA/USP usando um tubo de raios X com alvo ânodo de Mo, com filtro de Zr, operado em 30 keV e 40 mA. A detecção foi realizada com um detector de Si(Li) e o tempo de aquisição foi de 300 s.

2.2 Amostras ambientais

Treze amostras de água, seis de sedimento, duas de capim, uma de sal e três de ração mineral foram coletadas de pequenas propriedades rurais da região de estudo. As amostras de água foram filtradas em membranas de ésteres de celulose (47mm de diâmetro e 0,45 μm de tamanho de poro) para retenção do material particulado em suspensão e posteriormente para obtenção da fração de metais dissolvidos. A metodologia de pré-concentração foi realizada com APDC como agente quelante precipitador [9].

As amostras sólidas (capim, sedimento, ração e sal) foram secas a 60 °C por 24h e analisadas *in natura*, acondicionadas em recipientes específicos recobertos com filme de mylar para irradiação e análise direta por EDXRF.

Amostras de sedimento e sal foram secas, maceradas e peneiradas em malha de 125 μm de tamanho de partícula. As amostras de capim foram cortadas, secas e maceradas até atingirem a forma de pó, e sendo então submetidas à mesma preparação das amostras de sedimento.

O procedimento de quantificação foi realizado através de curvas de calibração. Para as membranas de água e para o capim (0,3 g acondicionados nos recipientes para XRF), classificadas como amostras finas, os valores de sensibilidade foram obtidos medidas de padrões Micromatter em membranas. Para certificação da acurácia, os materiais de referência certificados SRM1640 e SRM1643e foram medidos para a água e o padrão PTXRF-IAEA06 para capim.

Para as amostras de sedimento, seis materiais de referência certificados de solo e argila foram usados na calibração (IAEA-375, IAEA-SL2, IPT42, IPT51, IPT57 e IPT63), e o padrão PTXRF-IAEA04 foi usado para verificação da acurácia das curvas de calibração.

A concentração elementar de todas as amostras ambientais foi determinada em laboratório por Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia (EDXRF) empregando um sistema portátil PXRF-LFNA02, do Laboratório de Física Nuclear Aplicada da UEL, o qual é composto por um detector de Si-PIN (resolução de 221 eV para a linha de 5,9 keV, com janela de Be de 25 μ m) e um mini tubo de raios X (de Ag, 40kV, 100mA, 0,7 mm de tamanho de foco, com filtro de Ag de 50 μ m). As condições de medidas foram 28kV, 10 μ A e 500s de tempo de irradiação.

3 Resultados e discussão

3.1 Amostras de sangue

Os resultados da análise por TXRF do material de referência IAEA-A-13, para certificação da metodologia são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Valores certificados e medidos por TXRF do padrão IAEA-A-13. Valores em mg L⁻¹ com desvios de 95% de confiança

Elemento	Valor Certificado	Valor Medido
K	2100-2700	1958 \pm 229
Ca	226-332	311 \pm 28
Fe	2200-2500	2262 \pm 157
Zn	12-14	92 \pm 2

Para K, Ca e Fe os resultados foram equivalentes dentro dos desvios. Para o Zn o valor obtido foi muito acima do certificado em função de interferência espectral de outros elementos presentes no padrão de sangue. Os limites de detecção (LLD) obtidos foram, em mg L^{-1} , 31 (K), 20 (Ca), 7 (Fe), 2 (Zn).

Na tabela 2 estão os valores de concentração para as amostras de sangue analisadas.

Tabela 2. Concentração dos elementos encontrados nas amostras de sangue. Valores em mg L^{-1} com desvios de 95% de confiança

Amostra	K	Ca	Fe
P1a	477±15	99±3	
P1b	239±9	81±9	
P1c	204±7	210±19	229±5
P4a	363±19	165±3	418±114
P4b	209±7	405±18	
P5a	260±2	248±11	284±2
P5b	553±35	259±19	282±12
P5c	214±3	124±7	174±7
P8a	334±7	481±20	270±34
P8b	169±12	84±2	
P12a	235±17	291±13	187±15
P12b	226±15	160±15	195±7
P12c	281±15	115±8	232±

3.2 Amostras de água

Nas amostras analisadas, foi encontrado somente o Fe acima do limite de quantificação do sistema portátil de medidas, cujo valor é da ordem de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para elementos de número atômico entre 20 e 35 e para o Pb [10]. A figura 1 apresenta o resultado quantitativo obtido para Fe dissolvido, com 95% de confiança. Os valores certificados, em mg L^{-1} , para os padrões de água SRM1640 e SRM1643e são $0,0343 \pm 0,0016$ e $0,056 \pm 0,001$ respectivamente. Os valores quantificados usando padrões MicroMatter foram $0,047 \pm 0,003$ e $0,110 \pm 0,008$ respectivamente. A diferença entre os valores medidos e os certificados deve-se principalmente ao efeito matriz, visto que o grande número de elementos presente no padrão gera fenômenos de in-

terferência e reforço. Apesar da discrepância, os valores apresentam-se na mesma ordem de grandeza.

Nas amostras analisadas identificou-se contaminação no ponto P10. Neste ponto o valor encontrado é mais de três vezes maior que o permitido pela regulamentação [11].

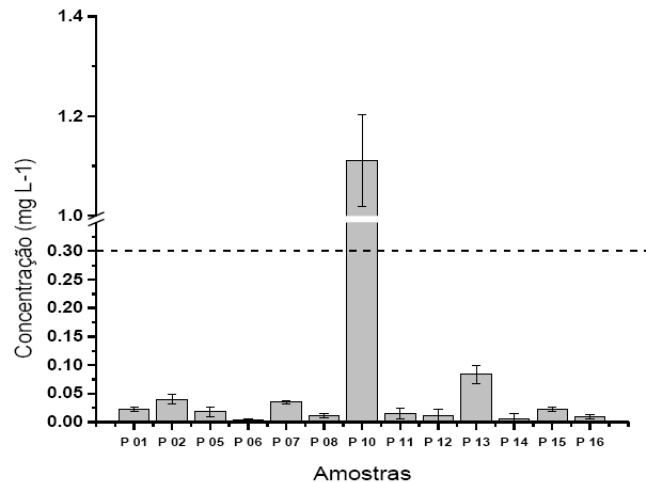


Figura 1. Resultados quantitativos para Fe dissolvido em água. A linha pontilhada expressa os valores máximos permitidos segundo a regulamentação do CONAMA, 2005[11]

3.3 Amostras de capim

Os valores certificados (PTXRF-IAEA06) e medidos para as amostras de capim estão na tabela 3.

Tabela 3. Valores de concentração, em mg kg^{-1} para o material de referência de capim PTXRF-IAEA06. Desvios com 95% de confiança

Elemento	Valor Certificado	Valor Medido
Mn	$80,4 \pm 10,8$	$46,3 \pm 0,4$
Fe	474 ± 48	351 ± 6
Ni	$8,26 \pm 1,31$	$4,7 \pm 0,2$
Cu	$15,0 \pm 1,5$	$11,8 \pm 2,4$
Zn	$78,7 \pm 7,1$	$74,1 \pm 1,4$

Foram analisadas duas amostras de capim, cujos resultados estão na tabela 4. Na amostra P10 foi encontrado chumbo.

Tabela 4. Resultados quantitativos dos elementos encontrados nas amostras de capim. Valores em mg kg⁻¹ com desvio padrão

Elemento	P10	P12
Ti	350±75	2454±409
Mn	444±99	930±68
Fe	2787±824	27049±4238
Zn	30,0±6,8	<LLD
Rb	29,2±5,2	<LLD
Zr	178±77	125±28
Pb	9,0±2,6	<LLD

A concentração de elementos na pastagem depende da qualidade do solo, bem como do cultivar existente anteriormente no local utilizado com essa finalidade. Além disso, a utilização indiscriminada de defensivos agrícolas pode favorecer a deposição de elementos indesejáveis no solo ou diretamente na pastagem. A lixiviação do solo, dependente do clima local, também influencia nessa concentração [12].

3.4 Amostras de sedimento

A tabela 5 apresenta os resultados para o material de referência de argila.

Nas amostras de sedimento, foram identificados K, Ca, Ti, Mn, Fe, Zn, Br, Rb, Sr, Y, Zr e Pb, com destaque para a presença de Br e Pb em alguns pontos, conforme mostra a figura 2.

Tabela 5. Valores de concentração para o padrão de argila PTXRF-IAEA04. Os valores de desvio estão com 95% de nível de confiança

Elemento	Valor Certificado	Valor Medido
K(%)	1,96±0,07	1,25±0,03
Ti(%)	0,60±0,02	0,67±0,06
Mn(mg kg ⁻¹)	230±13	366±9
Fe(%)	4,99±0,16	5,01±0,03
Zr(mg kg ⁻¹)	176,70±9,04	119±5

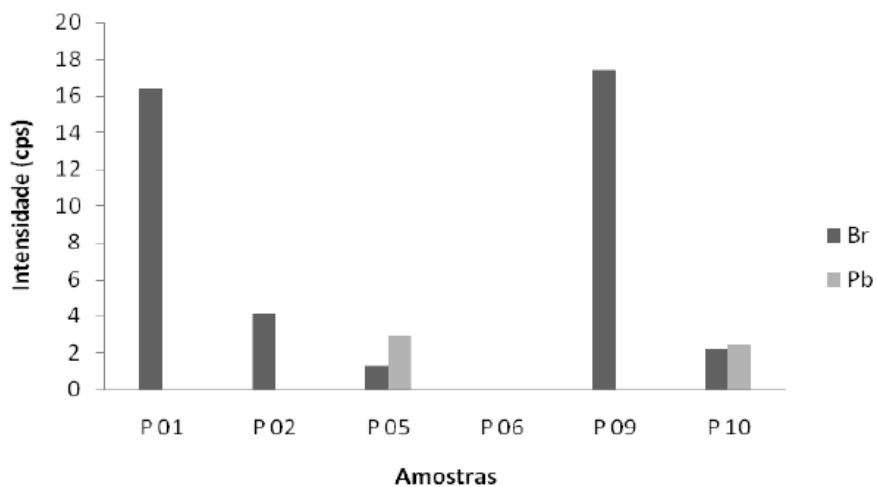


Figura 2. Resultados qualitativos de Br e Pb para as amostras de sedimento

A tabela 6 apresenta os resultados quantitativos para Fe, Ti e Zr. Toda análise qualitativa foi baseada na razão pico/fundo, onde a área líquida do pico de interesse é dividida por 3 vezes o seu desvio padrão. Os dados apresentados referem-se aos valores das áreas líquidas para as quais as razões calculadas foram maiores que 1.

Tabela 6. Valores de concentração dos elementos nas amostras de sedimento. Valores com 95% de confiança

Amostra	Ti(%)	Fe(%)	Zr (mg kg ⁻¹)
P1	3,6±0,2	13,7±0,5	436±36
P2	0,13±0,02	0,50±0,03	64±23
P5	0,95±0,04	0,035±0,004	39±15
P6	1,7±0,1	11,7±0,3	52±25
P9	2,9±1,0	13,1±4,6	495±183
P10	1,36±0,05	6,86±0,20	445±59

3.5 Amostras de ração

Na figura 3, estão os elementos identificados nas amostras de ração animal e sal utilizadas pelos produtores para alimentar alguns dos animais analisados.

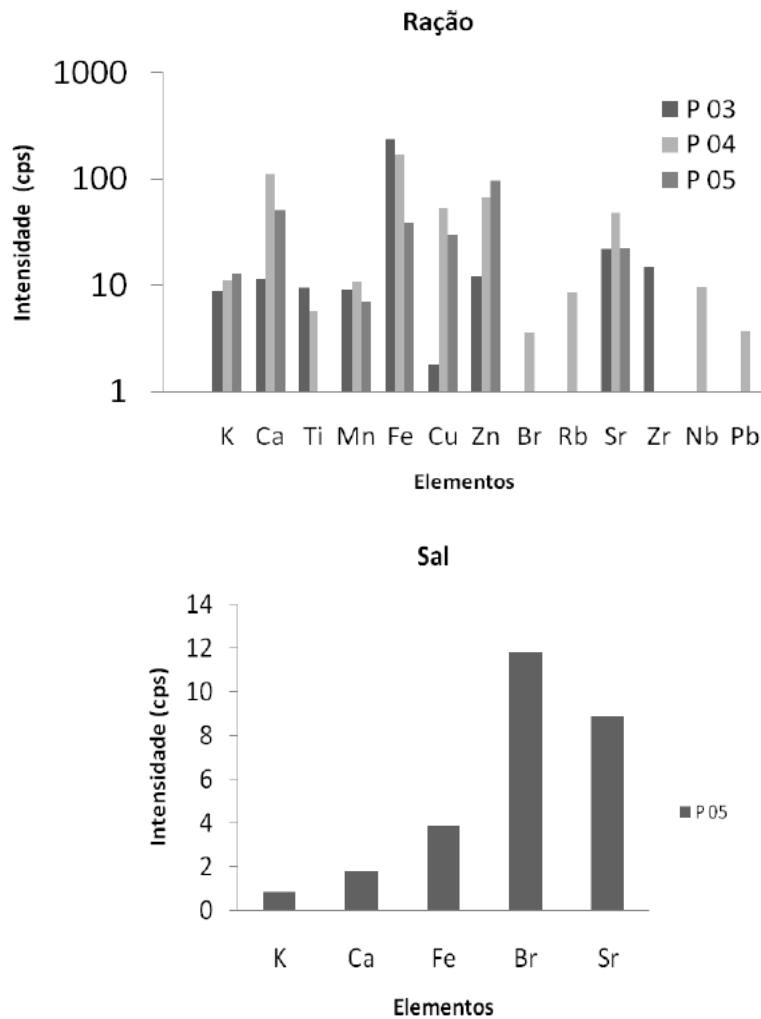


Figura 3. Elementos encontrados nas amostras de ração e sal

4 Conclusão

A técnica de XRF possibilitou a análise de diferentes amostras, visando encontrar contaminação por metais pesados. Neste caso, foram identificadas regiões com maior possibilidade de contaminação.

Foi identificado Pb em amostras de capim, sedimento e ração, em diferentes áreas. A contaminação por Fe foi constatada em uma amostra de água.

A técnica de EDXRF possibilitou a delimitação geográfica com regiões de maior

contaminação, onde técnicas analíticas específicas podem ser aplicadas, dependendo do interesse, reduzindo o custo das análises, descartando a amostragem em regiões sem indicação de contaminantes.

Apesar de ter sido encontrado Pb em algumas amostras, ele não foi identificado em nenhuma das amostras de sangue analisadas, em função do limite de detecção da técnica e/ou da pequena quantidade transferida ao organismo do animal.

5 Agradecimentos

Projeto avaliado e aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP – Botucatu – São Paulo, pertencente à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, segundo o Protocolo Nº 130/2006-CEEA, da data de 29 de novembro de 2006.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni coordenador do Laboratório de Física Nuclear Aplicada da UEL, pelo uso do equipamento de EDXRF.

6 Referências

- [1] SWARUP, D.; PATRA, R. C. Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; transfer of lead into milk. *Sci Total Environ*, v. 347, p. 106–110, 2005.
- [2] DUARTE, R. P. S.; PASQUAL, A. Avaliação do cádmio (Cd), chumbo (Pb), níquel (Ni) e zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. *Energia na Agricultura*, v. 15, n. 1, p. 46–58, 2000.
- [3] SOUZA, M. V.; VIANNA, M. W. S.; ZANDIM, B. M.; FERNANDES, R. B. A.; FONTES, M. P. F. Metais pesados em amostras biológicas de bovinos. *Cienc Rural*, v. 39, n. 6, p. 1774–1781, 2009.
- [4] BUTURE, I. O.; MARÇAL, W. S. Teores de chumbo e cádmio em suplementos minerais para bovinos comercializados no estado do Paraná. *Arch Vet Sci*, v. 10, p. 51–56, 2005.

- [5] MARÇAL, W. S.; CAMPOS NETO, O.; NASCIMENTO, M. R. Valores sanguíneos de chumbo em bovinos Nelore suplementados com sal mineral naturalmente contaminado por chumbo. *Cienc Rural*, v. 28, p. 53–57, 1998.
- [6] MELQUIADES, F. L.; APPOLONI, C. R. Application of XRF and field portable XRF for environmental analysis. *Radia Phys Chem*, v. 262, p. 533–541, 2004.
- [7] VANHOOF, C.; CORTHOOTS, V.; TIREZ, K. Energy-dispersive X-Ray fluorescence systems as analytical tool for assessment of contaminated soils. *J Environ Monit*, v. 6, p. 344–350, 2004.
- [8] BATTISTELLI, M.; CAMARGO FILHO, M.; HEERDT, B. Proteção e manejo da bacia do Rio das Pedras. In: Levantamento e análise dos pontos de coleta das águas da rede hidrográfica do Rio das Pedras, Guarapuava – PR, editado por Quináia, S. P.; Maciel, J. M.; Rosa, M. R.; Gráfica B&D, p. 35–42, 2004.
- [9] MELQUIADES, F. L.; PARREIRA, P. S.; YABE, M. J.; CORAZZA, M. Z.; FUNFAS, R. Factorial design for Fe, Cu, Zn, Se and Pb preconcentration optimization with APDC and analysis by portable X-Ray Fluorescence. *Talanta*, v. 73, p. 121–126, 2007.
- [10] MELQUIADES, F. L.; PARREIRA, P. S.; APPOLONI, C. R.; SILVA, W. D.; LOPES, F. Quantification of metals in river water using a portable EDXRF system. *Appl Radiat Isot*, v. 69, p. 327–333, 2010.
- [11] CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Resolução n. 375, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, 2005.
- [12] PERES, J. A.; SAKATE, M. Utilização de bovinos como biomonitorios ambientais. *Braz J Toxicology*, 2009, 327 p.

