

**PURIFICAÇÃO DE CO<sub>2</sub> SINTETIZADO DE AMOSTRAS DE OSSOS DESTINADAS À DATAÇÃO POR <sup>14</sup>C VIA ESPECTROMETRIA DE CINTILAÇÃO LÍQUIDA**

Claudio Sergio Lisi, Luiz Carlos Ruiz Pessenda, Maria Valéria Lopes Cruz, Gláucia Pessin

Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP - CP 96 - 13400-970 - Piracicaba - SP

Mieczyslaw F. Pazdur "in memoriam"

Silesian Technical University - Institute of Physics - PL 44-100 Gliwice - Poland

Recebido em 15/12/95; aceito em 5/7/96

**THE PURIFICATION OF CO<sub>2</sub> MADE FROM BONE SAMPLES FOR THE PURPOSE OF RADIOCARBON DATING BY LIQUID SCINTILLATION SPECTROMETRY.** The methodology for radiocarbon dating has been developed and adapted. Collagen, the most representative organic fraction used for radiocarbon age determination of bone samples, has been extracted by the Longin method. To eliminate/minimize the contamination by gaseous compounds (nitrogen oxides) produced during the collagen combustion, three methods have been used: CO<sub>2</sub> oxidation with iodine - potassium iodine solutions and CO precipitation as BaCO<sub>3</sub> and SrCO<sub>3</sub>, and subsequent acid hydrolysis. The combustion efficiency of collagen samples, the performance of the methods in the CO<sub>2</sub> purification and the effect of atmospheric <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> contamination and radioactivity of the reagents in the determination of <sup>14</sup>C activity has been quantified. To verify the accuracy of the method, bone and collagen samples have been analyzed and the results compared with the <sup>14</sup>C laboratories of Gliwice, Poland and Groningen, The Netherlands.

**Keywords:** CO<sub>2</sub> purification; bone samples; radiocarbon dating; liquid scintillation spectrometry.

**INTRODUÇÃO**

A datação por <sup>14</sup>C é um método utilizado na definição de idades de amostras contendo carbono e relacionadas com eventos arqueológicos e paleoambientais. Este radionuclídeo é produzido na estratosfera pela reação entre nêutrons cósmicos (radiações secundárias) e átomos de <sup>14</sup>N, sendo posteriormente oxidado a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> e distribuído pela atmosfera, de onde é assimilado primária e constantemente pelos vegetais via fotossíntese e posteriormente pelos animais. A assimilação cessa com a morte do organismo, persistindo apenas o decaimento radioativo de acordo com a meia-vida do <sup>14</sup>C (5730 ± 30 anos). Assim, comparando-se a atividade remanescente da amostra com a atividade de um padrão moderno de referência (ácido oxálico - NBS), pode-se determinar a idade da amostra em anos AP (Antes do Presente).

Dentre as amostras analisadas encontram-se carbonatos de águas subterrâneas, matéria orgânica de solos superficiais, turfas, conchas, madeira, carvão, ossos, entre outras.

O objetivo deste trabalho foi o estudo e o aprimoramento de metodologia para a datação de amostras de ossos por <sup>14</sup>C, utilizando-se benzeno sintetizado como composto de contagem e a técnica de cintilação líquida de baixo nível de radiação de fundo para a detecção do radionuclídeo. Para isso tornou-se necessária a eliminação de contaminantes oriundos da composição proteica do colágeno extraído de amostras de ossos, através de processos de pré-tratamentos físico e químico.

Estudou-se os procedimentos para a extração do colágeno<sup>1</sup>, fração orgânica do osso que se mantém preservada durante a fossilização e três métodos químicos para eliminação/minimização de contaminantes gasosos nitrogenados produzidos juntamente com o CO<sub>2</sub> durante o processo de combustão do colágeno. Estes contaminantes afetam significativamente as etapas de síntese, diminuindo o rendimento de produção de benzeno, com conseqüente prejuízo na exatidão e precisão analítica.

Testes preliminares de síntese benzênica de colágeno demonstraram que, conjuntamente com o CO<sub>2</sub>, que no estado sólido a -180°C apresenta coloração branca, extraia-se um

material de coloração azul, tornando-se castanho-avermelhado de acordo com a mudança de temperatura do meio (25°C), indicando a presença significativa de compostos nitrogenados (N<sub>2</sub>O, NO<sub>2</sub>, entre outros)<sup>1</sup>.

Para verificar a exatidão do método proposto, efetuou-se intercomparação de resultados com laboratórios de <sup>14</sup>C da Universidade de Gliwice - Polônia, e Groningen - Holanda.

**PARTE EXPERIMENTAL**

Na extração do colágeno das amostras de ossos<sup>1</sup> utilizou-se o seguinte procedimento: eliminação das impurezas visíveis através de limpeza física e pulverização da amostra à dimensões inferiores que 0,25 mm; descalcificação com solução ácida (HCl 8% v/v); aquecimento do precipitado a 80°C durante 8 horas em pH 3, para a extração do colágeno; eliminação de resíduos sólidos através de centrifugação a 3000 rpm e secagem da amostra a 60°C.

Para a realização dos experimentos, utilizou-se uma amostra de osso recente, cuja massa obtida após a pulverização (3,26 kg) foi dividida em frações de 500 g para a extração do colágeno. Foi utilizada a quantidade de 9 g de colágeno para cada síntese de benzeno, composto que contém o <sup>14</sup>C residual da amostra a ser determinado por cintilação líquida.

Em um sistema de vácuo (Figura 1), procedeu-se a combustão do colágeno, utilizando-se um tubo de quartzo aquecido a 650°C sob fluxo constante de oxigênio comercial, produzindo CO<sub>2</sub> e óxidos de nitrogênio (contaminantes). Utilizou-se óxido de cobre e cromato de chumbo aquecidos a 600°C no interior do mesmo tubo, promovendo a oxidação de CO e a eliminação de enxofre, respectivamente. No caso de síntese das amostras de mármore, que serviram para verificar a contaminação dos reagentes utilizados, a produção do CO<sub>2</sub> realizou-se por meio de reação com solução de HCl 1:1 (v/v), em um balão de vidro. Os produtos de combustão foram armazenados em tanques de 5 litros e submetidos aos experimentos de purificação e/ou aos demais processos de síntese.

As etapas posteriores de síntese consistiram em: reação do

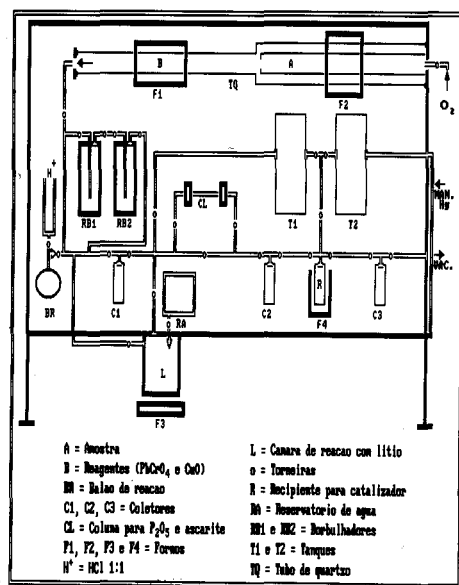


Figura 1. Sistema de síntese de benzeno.

$CO_2$  com lítio metálico ( $600^\circ C$ ), produzindo carbeto de lítio e hidrólise do carbeto para produção de acetileno. O benzeno foi produzido através da trimerização do acetileno utilizando-se um catalisador (cromo-sílica-alumina).

Três métodos foram empregados para a eliminação/minimização do teor de óxidos de nitrogênio produzidos na combustão de amostras de colágeno:

Método I - Oxidação dos contaminantes por reação com soluções de  $KMnO_4$  e  $I_2$ ;

Método II - Precipitação de  $BaCO_3$  por reação entre o  $CO_2$  e solução de  $BaCl_2$  2,3 mol. $L^{-1}$ ;

Método III - Precipitação de  $SrCO_3$  por reação entre o  $CO_2$  e solução de  $SrCl_2$  1,8 mol. $L^{-1}$ .

Para os procedimentos do método I, adaptou-se ao sistema de síntese de benzeno dois frascos borbulhadores, nos quais foram acondicionadas as soluções oxidantes (Figura 1). O primeiro frasco (RB1) com solução de  $KMnO_4$  3% (m/v) em volume de 250 mL e o segundo frasco (RB2) com solução de  $KI + I_2$  em concentrações variáveis, utilizando-se também um volume de 250 mL. A concentração de referência<sup>2</sup> utilizada foi  $KI$  9% e  $I_2$  0,45% (m/v), variando-se as respectivas concentrações para 4,5% e 0,23% e 18% e 0,9%, durante a realização dos experimentos.

Para os métodos II e III, adaptou-se ao sistema de síntese de benzeno (Figura 1), um frasco borbulhador (RB1) para a retenção do  $CO_2$  em solução de  $NH_4OH$  25% (v/v) em volume de 250 mL, e utilizou-se o sistema de vácuo apresentado na figura 2 para a precipitação dos carbonatos de bário ou estrôncio.

Durante o desenvolvimento do método II, manteve-se constante a concentração da solução de  $BaCl_2$  e variou-se o volume em 300, 400, 500 e 600 mL, com a finalidade de calcular o rendimento de conversão do  $CO_2$  à carbonato. A primeira etapa do procedimento, consistiu em reação do  $CO_2$  com solução de  $NH_4OH$ , por borbulhamento (Figura 1 - RB1). A segunda etapa foi procedida transferindo-se o frasco borbulhador para o sistema de produção de carbonato (Figura 2), onde realizou-se a reação do carbonato de amônio com a solução de  $BaCl_2$  previamente aquecida a  $100^\circ C$ , precipitando-se  $BaCO_3$  (Kt). Eliminou-se resíduos de amônio ainda presentes, utilizando-se água destilada e filtração (FB) e transferiu-se o carbonato para uma estufa onde foi seco a  $60^\circ C$ .

O carbonato de bário produzido foi transferido para o gotejador do sistema de síntese de benzeno (Figura 1 - BR)

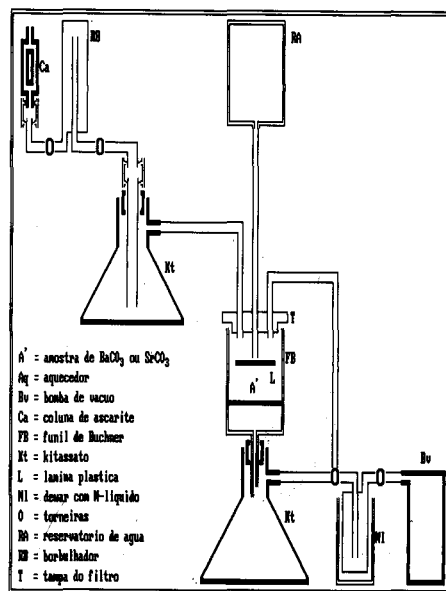


Figura 2. Sistema de síntese de carbonato.

para a obtenção de  $CO_2$ , livre de impurezas, através de reação com solução de  $HCl$  1:1 (v/v), e posterior síntese do benzeno.

No método III, produziu-se  $SrCO_3$  através da reação do  $CO_2$  com solução de  $SrCl_2$ , variando-se o volume da solução em 300, 400, 500 e 600 mL. O procedimento efetuado foi idêntico ao utilizado para a produção de carbonato de bário.

Com a produção do  $CO_2$  a partir de amostras de colágeno purificadas pelos procedimentos descritos, efetuou-se a síntese de benzeno e analisou-se a atividade do  $^{14}C$  das amostras em espectrômetros de cintilação líquida de baixo nível de radiação de fundo, modelo Packard 1550. O volume produzido de benzeno (3 mL, equivalente a 2,637 g de C) foi acondicionado em frascos especiais de contagem de baixo teor de  $^{40}K$ , com capacidade para 7 mL, adicionando-se também 0,5 mL de solução contendo tolueno (1 litro) e solutos cintiladores (PPO e POPOP), dissolvidos na proporção de 43,75 g e 2,59 g, respectivamente<sup>3</sup>.

Para a detecção da atividade de  $^{14}C$  por espectrometria de cintilação líquida, procedeu-se com as contagens em intervalos de 100 min, até um tempo total de 3000 minutos. Os valores obtidos foram submetidos a um procedimento estatístico rotineiramente utilizado<sup>3</sup>, onde através da média das contagens eliminou-se as que apresentaram desvio padrão superior a  $\pm 3$  relativo a distribuição normal. Corrigiu-se as idades obtidas para o fracionamento isotópico, utilizando-se valores de  $^{13}C$  obtidos por análises isotópicas realizadas na Seção de Isótopos Estáveis do CENA.

Após otimizações analíticas, realizou-se intercomparações laboratoriais de resultados para amostras de colágenos e ossos brutos cedidos pelo Laboratório de  $^{14}C$  de Gliwice - Polônia. As seguintes amostras foram analisadas: A) três colágenos extraídos pelo laboratório polonês, e identificadas como: Grabie 4/27, Krusza Podlotowa 8/3 e Naciekowa Cave; B) duas amostras de ossos, datados pelos laboratórios de Gliwice - Polônia e Groningen - Holanda, e identificadas como: Kierskowo 1 EF/m10p1 e Kierskowo 1 EF/m10p3. Destas amostras foram extraídos colágenos no Laboratório de  $^{14}C$  do CENA/USP, que posteriormente foram sintetizadas e analisadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Eficiências de Combustão do Colágeno

Verificou-se que os valores de eficiência de combustão dos colágenos analisados mantiveram-se acima de 95%, conforme

observa-se na tabela 1. Para as amostras Grabie 4/27, Krusza Podlotowa 8/3 e Naciekowa Cave as eficiências de combustão foram de 95,4%, 95,8% e 97,8%, respectivamente, sendo estas amostras preparadas pelo laboratório polonês. As amostras Kierzkowo 1 EF/m10p1 e Kierzkowo 1 EF/m10p3, cujos colágenos foram preparados no laboratório do CENA, apresentaram eficiências de 97,9% e 97,5%, respectivamente, podendo-se verificar que a qualidade do colágeno extraído pelo Laboratório de  $^{14}\text{C}$  do CENA foi comparável ao extraído pelo Laboratório de  $^{14}\text{C}$  de Gliwice.

**Tabela 1.** Eficiências de combustão de colágenos.

Amostras	Colágeno (g)	Cinzas (g)	Eficiência (%)
Grabie	10,0	0,46	95,4
Krusza	4,3	0,18	95,8
Naciekowa	7,4	0,16	97,8
Kierzkowo.1	6,2	0,13	97,9
Kierzkowo.3	2,0	0,05	97,5

### Oxidação dos Contaminantes Nitrogenados com $\text{KMnO}_4$ e $\text{I}_2$

Obteve-se médias de 93, 92 e 88% para eficiências de produção de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2$  e  $\text{C}_6\text{H}_6$ , respectivamente, que foram comparáveis as médias de 95% para  $\text{CO}_2$ , 93% para  $\text{C}_2\text{H}_2$  e 90% para  $\text{C}_6\text{H}_6$ , obtidas em análises de amostras padrão de mármore e carvão mineral (P. A.)<sup>3</sup>. Verificou-se que a solução de iodo de concentração inferior (KI 4,5% e  $\text{I}_2$  0,23% m/v), não foi eficaz para a purificação das amostras, pois observou-se no "trap" de coleta de  $\text{CO}_2$  significativa coloração azul, característica dos contaminantes nitrogenados, enquanto que a solução de iodo de concentração superior a de referência (KI 18% e  $\text{I}_2$  0,9% m/v), promoveu significativo efeito de volatilização, impedindo uma análise melhor sobre a eliminação dos contaminantes nitrogenados. Fez-se então a opção pela solução de referência (KI 9% e  $\text{I}_2$  0,45% m/v), que demonstrou significativa eliminação dos contaminantes, não sendo observada a coloração característica dos contaminantes junto ao  $\text{CO}_2$  produzido, onde também não se observou o efeito de volatilização do iodo.

### Purificação dos Contaminantes Nitrogenados com $\text{BaCl}_2$

Verificou-se para as amostras de mármore que aumentando-se o volume da solução de  $\text{BaCl}_2$  de 300 para 400 mL, o rendimento de conversão de  $\text{BaCO}_3$  à  $\text{CO}_2$  aumentou em média de 83,5% para 94%, chegando a 96,5% quando utilizou-se 600 mL (Tabela 2). Devido a diferença de apenas 2,5% fez-se a opção pelo volume de 400 mL. Observou-se também que o processo de precipitação de  $\text{BaCO}_3$  eliminou totalmente a

**Tabela 2.** Rendimento de conversão de  $\text{BaCO}_3$  à  $\text{CO}_2$ .

Amostras	Tratamento	Rendimento (%)
Mármore.1	A	82
Mármore.2	A	85
Mármore.6	B	94
Mármore.7	B	94
Mármore.8	C	96
Mármore.9	C	94
Mármore.10	D	97
Mármore.11	D	96

Tratamentos: solução 1,15 mol.L<sup>-1</sup> de  $\text{BaCl}_2$ , com volumes de: A = 300 mL; B = 400 mL; C = 500 mL; D = 600 mL

presença de óxidos de nitrogênio da amostra de colágeno, devido ao  $\text{CO}_2$  produzido após a precipitação do carbonato apresentar-se totalmente incolor, sem a coloração azul característica dos óxidos de nitrogênio.

### Purificação dos Contaminantes Nitrogenados com $\text{SrCl}_2$

As médias de produção de  $\text{CO}_2$  após conversão a carbonato utilizando-se  $\text{SrCl}_2$ , apresentaram-se entre 93,3% para volume de 600 mL de solução de cloreto e 96,4% para de 300 mL (Tabela 3), demonstrando portanto efeito superior ao apresentado pelo  $\text{BaCl}_2$  para menor volume de solução. Neste caso optou-se pelo volume de 300 mL, que foi utilizado para a amostra padrão de carvão mineral (CM) com um rendimento de produção de  $\text{CO}_2$  de 93,2%. Verificou-se que o processo de precipitação de  $\text{SrCO}_3$  eliminou totalmente a presença de óxidos de nitrogênio, de forma idêntica ao  $\text{BaCO}_3$ . Verificou-se ainda que o reagente  $\text{SrCl}_2$  não apresentou contaminação radioativa como observado para o reagente  $\text{BaCl}_2$ , cujos resultados encontram-se discutidos no próximo ítem.

**Tabela 3.** Rendimento de conversão de  $\text{SrCO}_3$  à  $\text{CO}_2$ .

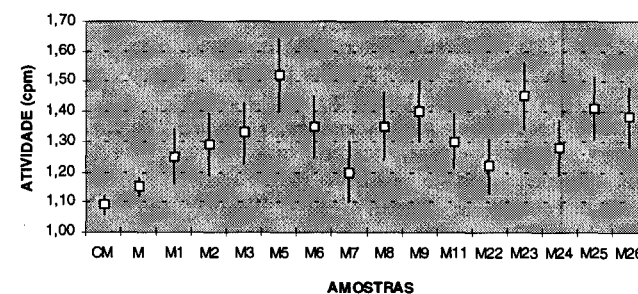
Amostras	Tratamento	Rendimento (%)
Mármore.12	A	97,2
Mármore.13	A	95,7
Mármore.14	B	93,0
Mármore.15	B	94,5
Mármore.16	C	94,8
Mármore.17	C	93,8
Mármore.20	D	90,5
Mármore.21	D	96,2
CM	A	93,2

Tratamentos: solução 0,9 mol.L<sup>-1</sup> de  $\text{SrCl}_2$ , com volumes de: A = 300 mL; B = 400 mL; C = 500 mL; D = 600 mL

### Contaminação Radioativa do Reagente

Os valores característicos da radiação de fundo (background) observada para amostras de carvão mineral (CM) e mármore (M) que foram analisadas sem o uso do  $\text{BaCl}_2$  Merck apresentaram  $1,09 \pm 0,03$  e  $1,15 \pm 0,03$  cpm (contagens por minuto), respectivamente (Figura 3). No entanto, verificou-se que após o procedimento de purificação dos contaminantes nitrogenados, utilizando-se a precipitação de  $\text{BaCO}_3$ , os valores de atividade das amostras de carvão mineral aumentaram para  $1,23 \pm 0,09$  cpm, e para as amostras de mármore os valores mostraram-se variáveis e superiores a  $1,20 \pm 0,09$  cpm, evidenciando a contaminação radioativa das amostras.

Pode-se observar que mesmo após o desenvolvimento do sistema à vácuo de precipitação de carbonato (amostras M22 e M26), onde eliminou-se a entrada de  $\text{CO}_2$  atmosférico, os resultados foram superiores aos dos padrões de background,



**Figura 3.** Atividade do C-14 em amostras purificadas com  $\text{BaCl}_2$ .

**Tabela 4.** Intercomparação laboratorial de resultados.

Amostra	Material	Código laboratório	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Idades (anos AP)
A) Kierzkowo 1 EF/ml0p1	osso	Gd-4406	- 23,9	4310 $\pm$ 90
		GrN-15411		4270 $\pm$ 40
		CENA-388		4290 $\pm$ 80
B) Kierzkowo 1 EF/ml0p3	osso	Gd-4404	- 26,2	4230 $\pm$ 90
		GrN-15412		4135 $\pm$ 40
		CENA-392		4130 $\pm$ 170
C) Grabie 4/27	colágeno	Gd-2644 CENA-389	- 21,2	3650 $\pm$ 90 4160 $\pm$ 70
D) Krusza Podlotowa 8/3	colágeno	Gd-5118 CENA-390	- 17,1	3190 $\pm$ 60 3010 $\pm$ 90
E) Naciekowa Cave	colágeno	Gd-1924 CENA-391	- 25,1	2350 $\pm$ 40 2710 $\pm$ 70

Código de laboratório: Gd = Gliwice; GrN = Groningen

indicando que a contaminação foi proveniente do  $\text{BaCl}_2$ , provavelmente devido ao radionuclídeo  $^{226}\text{Ra}$  presente em sua composição<sup>5</sup>.

A mesma tendência de contaminação radioativa causada pelo  $^{14}\text{CO}_2$  atmosférico foi observada nas amostras analisadas por precipitação de  $\text{SrCO}_3$ , antes do desenvolvimento do sistema de precipitação (amostras M12 a M28). No entanto, verificou-se que após a otimização do sistema (amostras M29 a M31), os valores apresentaram-se bastante próximos de  $1,15 \pm 0,03$  cpm, indicando que a contaminação observada foi devida somente ao  $^{14}\text{CO}_2$  atmosférico (Figura 4). Devido aos resultados obtidos, optou-se pelo uso do  $\text{SrCl}_2$ .

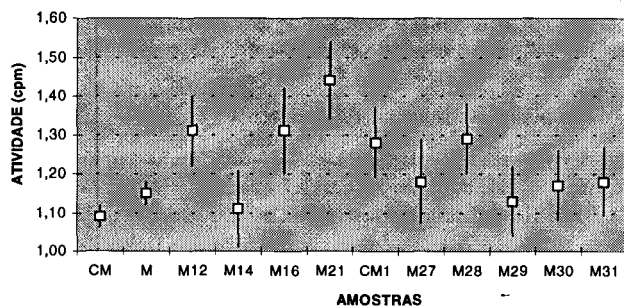


Figura 4. Atividade do C-14 em amostras purificadas com  $\text{SrCl}_2$ .

#### Intercomparação laboratorial de resultados

Os resultados das datações das amostras de ossos e colágenos utilizadas para a intercomparação laboratorial de resultados, realizadas pelos laboratórios de Gliwice - Polônia, de Groningen - Holanda e do CENA - Brasil, estão apresentados na tabela 4.

As duas amostras de ossos (A e B), além da amostra de colágeno (D), apresentaram resultados concordantes com os dois laboratórios europeus. Devido a amostra B não apresentar o teor de carbono suficiente para a obtenção dos 3 mL de benzeno necessários para a análise, efetuou-se diluição com benzeno espectrográfico, afetando-se a precisão ( $\pm 170$  anos), mas não a exatidão do resultado (4130 anos).

Com relação as amostras C e E, observou-se que os resultados não concordam dentro dos erros experimentais calculados, sendo que os obtidos pelo laboratório do CENA foram mais antigos, descartando-se portanto quaisquer possibilidades de contaminação radioativa atmosférica e/ou dos

reagentes utilizados no preparo de carbonatos. Porém, é importante ressaltar que todas as amostras analisadas no CENA foram preparadas dentro de curto período de tempo, mais precisamente 14 dias, sendo portanto utilizada a mesma calibração. Entretanto, para o laboratório de Gliwice deduz-se pelas identificações (Gd - 2644 e 1924), que são significativamente distantes das outras e que estas amostras foram analisadas em anos anteriores às demais, e eventualmente utilizando-se de calibrações distintas.

#### CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos e discussões apresentadas, concluiu-se que:

1. Desenvolveu-se e adaptou-se metodologia para extração de colágeno a partir de amostras de ossos.
2. O sistema de precipitação e filtragem de carbonatos desenvolvido, mostrou-se eficiente evitando a contaminação da amostra por  $^{14}\text{CO}_2$  atmosférico.
3. Dentre os três métodos de purificação estudados, o método de precipitação de  $\text{SrCO}_3$  apresentou-se adequado, pois não revelou contaminação radioativa como verificado com o  $\text{BaCl}_2$ , e também porque não observou-se a presença de contaminantes nitrogenados junto ao  $\text{CO}_2$  produzido após a precipitação do  $\text{SrCO}_3$ .
4. O método proposto, que foi desenvolvido e adaptado para a análise de  $^{14}\text{C}$  natural (datação) de amostras de ossos, mostrou-se exato e preciso.

#### AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), 92/4992-1, pelo suporte financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa científica oferecida. Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelo apoio à pesquisa.

#### REFERÊNCIAS

1. Longin, R.; *Tese de Doutorado* 1970, University of Lyon.
2. Gupta, S. K.; Polach, H. A.; *Radiocarbon dating practices at Australian National University*; Radiocarbon Dating Research; Camberra, 1985, p.180.
3. Pessenda, L. C. R.; Camargo, P. B.; *Quím. Nova* **1991**, *14*, 98.
4. Longin, R.; *Nature* **1971**, *230*, 241.
5. Suess, H.E.; *Science* **1954**, *120*, 5.