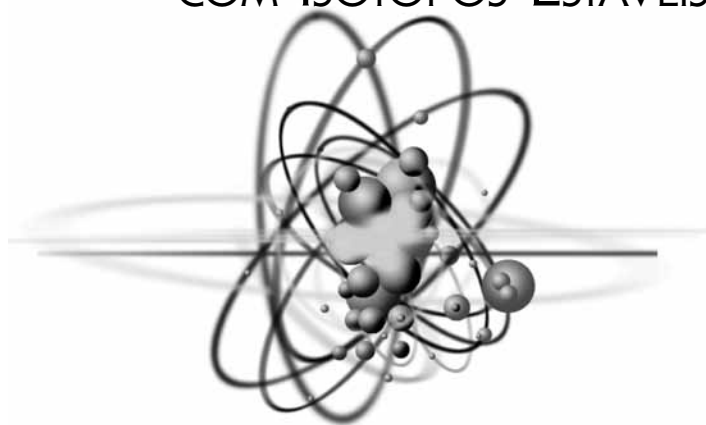


DESVENDANDO QUESTÕES AMBIENTAIS
COM ISÓTOPOS ESTÁVEIS



Apresentação

O principal propósito deste livro é oferecer a estudantes, professores e interessados em geral, uma visão básica e ampla sobre a aplicação de isótopos estáveis em vários campos da ciência. De maneira alguma pretendemos cobrir todos os campos de aplicação a que a metodologia isotópica se presta. Tal tarefa seria dificultada pelo número crescente de aplicações que surgem constantemente. Por outro lado, acreditamos que este livro oferece um alicerce sólido, que permitirá ao leitor explorar outros campos de aplicações dos isótopos. Nesse sentido, são apresentados tópicos que incluem os isótopos estáveis dos elementos mais comumente utilizados, ou seja, carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio.

Iniciamos este livro com um capítulo sobre definições e nomenclatura que, como todos os capítulos dessa natureza, não é atraente, mas é fundamental para o entendimento dos capítulos subsequentes. Passamos então a descrever os ciclos do carbono, do nitrogênio e da água, também fundamentais para o completo entendimento da metodologia isotópica. A seguir, concentramo-nos no ^{13}C , em capítulos sobre a variação desse isótopo presente na atmosfera, no ambiente terrestre (solos e plantas) e no ambiente aquático. O próximo isótopo abordado é o ^{15}N , com suas variações principalmente no ambiente terrestre (solos e plantas). Depois, temos uma parte mais aplicada, com o uso de isótopos estáveis em estudos de nutrição animal e humana, tanto contemporânea quanto em épocas pretéritas, e concluímos com o estudo de adulterações de alimentos e bebidas, de acordo com a metodologia isotópica. Dedicamos o capítulo final ao ciclo da água e seus isótopos ^{18}O e deutério.

Vale ainda mencionar algumas características deste livro que o fazem especial para nós. Em primeiro lugar, seus autores pertencem a cinco gerações de pesquisadores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena), órgão de integração da Universidade de São Paulo.

O Cena foi fundado em 1964 e lá estava Epaminondas Sansígolo Ferraz como um de seus fundadores. A segunda geração é representada por Reynaldo

Luiz Victoria, que foi orientado por Eneas Salati, um dos fundadores do Cena e pioneiro da espectrometria de massas no Brasil, contemporâneo de Epaminondas. Por sua vez, Reynaldo foi o orientador de Luiz Antonio Martinelli, membro da terceira geração e orientador de Plínio Barbosa de Camargo, contemporâneo de Marcelo Zacharias Moreira, ambos pertencentes à quarta geração. Em seu programa de doutorado, Jean Pierre Henry Balbaud Ometto foi orientado por Martinelli e co-orientado por Plínio Camargo, e pertence, assim, à quinta geração de pesquisadores do Cena.

Outra característica importante para nós é o fato de ser este o primeiro livro sobre isótopos estáveis em língua portuguesa. Existem inúmeros livros em outras línguas, principalmente inglês, mas nada comparável na nossa língua.

Finalmente, a grande maioria dos exemplos que permeiam os capítulos deste livro é oriunda de estudos conduzidos pelo nosso grupo. Esse fato contrasta inteiramente com livros escritos em outros países, nos quais a maioria dos exemplos refere-se a outra realidade que não a nossa.

Resta-nos encerrar esta breve apresentação com alguns agradecimentos indispensáveis. Em primeiro lugar, a Admar Cervelini (*in memoriam*) por sua ampla visão do futuro. A Eneas Salati, que deu os primeiros passos na espectrometria de massas e pela imensa paciência que teve com seu orientando Reynaldo Victoria. A Eiichi Matsui, que por tantos anos se dedicou ao nosso laboratório, e aos técnicos que nos têm acompanhado por todo esse tempo, especialmente a José Aurélio (Pingin) Bonassi, Maria Antonia (Tonica) Perez, Geraldo de Arruda Filho e Neusa Maria Augusti.

Sumário

1 Bases para uso da metodologia isotópica	9
1.1 Isótopos estáveis – Definição	9
1.2 Breve histórico	10
1.3 Conceitos importantes	12
1.4 Fracionamento isotópico: efeito termodinâmico e cinético	16
1.5 Modelo de mistura de duas fontes (diluição isotópica)	17
Bibliografia recomendada	18
2 Ciclos biogeoquímicos	19
2.1 O ciclo global do carbono	19
2.2 O ciclo global do nitrogênio	28
Bibliografia recomendada	33
3 Atmosfera	34
3.1 Introdução	34
3.2 Variações locais no $\delta^{13}\text{CO}_2$ da atmosfera	34
3.3 Variação secular na concentração e composição isotópica do CO_2 atmosférico	40
3.4 Variação entre hemisférios	41
Bibliografia recomendada	42
4 Vegetação	43
4.1 Definições	43
4.2 As plantas C_3 e a fotossíntese	44
4.3 As plantas C_4 e a fotossíntese	45
4.4 As plantas crassuláceas (CAM) e a fotossíntese	48
Bibliografia recomendada	49
5 Fatores ambientais e a composição isotópica das plantas	50
5.1 Intensidade de luz	50
5.2 Variação na fonte de CO_2	51
5.3 Variação simultânea da fonte de luz e da fonte de CO_2	52
5.4 Disponibilidade de água	54
Bibliografia recomendada	55

6 A composição isotópica dos solos	57
6.1 Introdução	57
6.2 Variação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ com a profundidade	58
6.3 Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas frações granulométricas do solo	61
6.4 Modelo de mistura e suas aplicações em estudos de solos	63
Bibliografia recomendada	64
7 Nitrogênio – solo e plantas	65
7.1 Introdução	65
7.2 Valores de $\delta^{15}\text{N}$ da matéria orgânica do solo	65
7.3 Valores de $\delta^{15}\text{N}$ de espécies de árvores nativas	69
7.4 Causas da variabilidade dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ em plantas	72
Bibliografia recomendada	78
8 A composição isotópica do carbono na hidrosfera	80
8.1 Introdução	80
8.2 Oceano	80
8.3 Rios e lagos	84
Bibliografia recomendada	90
9 Animais e sua dieta por meio dos valores de $\delta^{13}\text{C}$	92
9.1 Introdução	92
9.2 Balanço de carbono entre pequenos invertebrados e suas dietas	95
9.3 Relação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de tecidos animais e valores $\delta^{13}\text{C}$ de suas dietas	95
9.4 Relação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das frações bioquímicas dos animais e suas dietas	96
9.5 O uso de $\delta^{15}\text{N}$ em nutrição animal	97
9.6 Estudo de casos	98
Bibliografia recomendada	107
10 Adulteração de alimentos	109
10.1 Introdução	109
10.2 Estudo de casos	109
Bibliografia recomendada	122
11 Hidrologia isotópica	123
11.1 Introdução	123
11.2 A reta meteórica mundial e o valor d (excesso de deutério)	126
11.3 Composição isotópica das precipitações no globo terrestre	129
11.4 Hidrologia isotópica na Amazônia: alguns exemplos	134
Bibliografia recomendada	138
Referências bibliográficas	139

2

Cic/OS

Biogeoquímicos

Os ciclos biogeoquímicos referem-se à transferência de elementos químicos do universo abiótico para o universo biótico e vice-versa. Ou seja, os elementos minerais transferidos, e que passam a compor os tecidos de plantas e animais, retornam ao meio ambiente após a sua morte e decomposição. Considerando-se os macroatômos ou moléculas, os principais ciclos biogeoquímicos são: do carbono, da água (H_2O), do nitrogênio e do fósforo. Neste capítulo descrevem-se os ciclos do carbono e do nitrogênio, bem como as variações isotópicas associadas às diversas formas desses elementos na biosfera.

2.1 O CICLO GLOBAL DO CARBONO

2.1.1 INTRODUÇÃO

O elemento carbono é, provavelmente, o principal elemento da Terra. As razões que levam a essa afirmação são: (1) o carbono compõe de 40% a 50% da matéria orgânica viva; (2) os ciclos de outros elementos importantes, como nitrogênio e oxigênio, são altamente influenciados pelo ciclo do carbono; e (3) pela primeira vez, a humanidade está interferindo significativamente, em escala global, no ciclo biogeoquímico do carbono.

2.1.2 OS RESERVATÓRIOS E FLUXOS DE CARBONO

Na natureza, o carbono está presente, na forma elementar, como carbono amorfo, grafite e diamante. Por outro lado, átomos de carbono na forma não-elementar podem apresentar estados de oxirredução variando de $+4$ a -4 . Os grandes reservatórios de carbono contêm esse elemento mais comumente como dióxido de carbono (CO_2), com estado de oxidação de $+4$ ($C^{+4}O_2^{-4}$) e como carbonatos. Nesse último caso, dois reservatórios contêm a maior parte do carbono: a litosfera, onde o carbono encontra-se principalmente na forma de carbona-

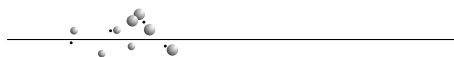
tos de cálcio $[\text{CaCO}_3]$, magnésio $[\text{Mg}(\text{CO}_3)_2]$ e férrico $[\text{FeCO}_3]$; e os oceanos, nas formas dissolvidas de $\text{H}_2\text{CO}_3(\text{aq})$, HCO_3^- e CO_3^{2-} .

O carbono no estado reduzido é “criado” pela fotossíntese (CH_2O). A forma mais reduzida de carbono é o metano (CH_4) produzido durante a respiração anaeróbia, com estado de oxidação -4 . Portanto, o ciclo do carbono, entre os diferentes compartimentos da Terra, é uma seqüência de reações de oxirredução.

2.1.3 ATMOSFERA

A molécula mais abundante na atmosfera é o dióxido de carbono (CO_2), seguindo-se, em menores concentrações, o metano (CH_4), o monóxido de carbono (CO), compostos orgânicos voláteis (COV), entre outros. Em 1954, Keeling e colegas começaram a medir a concentração de CO_2 na atmosfera próxima ao vulcão Mauna Loa (Havaí) e no Pólo Sul. O fato mais marcante dessa série histórica é a velocidade do aumento na concentração de CO_2 atmosférico em 50 anos, corroborando dados que indicam o aumento de cerca de 100 ppmv desde o início da Revolução Industrial, em meados do século XIX, atingindo valores atuais em torno de 375 ppmv. O aumento monitorado pela série de dados do Mauna Loa pode ser visualizado na Fig. 2.1. As duas principais causas para o aumento acentuado observado nas últimas décadas são: a queima de combustíveis fósseis e a queima de biomassa, principalmente nas regiões tropicais da Terra. Deve ser ressaltado que a emissão de combustíveis fósseis ocorre principalmente nos países mais desenvolvidos, localizados no Hemisfério Norte, onde a concentração de CO_2 atmosférico é maior. Sabemos também que a emissão de combustíveis fósseis é muito maior que as emissões causadas por mudanças no uso da terra. Esses dados denotam a importância dos países desenvolvidos, como maiores consumidores de combustíveis fósseis, nas alterações da composição atmosférica terrestre e, conseqüentemente, da “saúde climática” do planeta. Concentrações elevadas de CO_2 foram uma constante na história climática deste planeta. No entanto, não há registros de alterações na concentração de CO_2 atmosférico com a velocidade e intensidade observadas na história recente do planeta.

A principal conseqüência da mudança na concentração de CO_2 na atmosfera é o aumento do chamado “efeito estufa”, que é a propriedade de a atmosfera terrestre reter energia na forma de ondas longas emitidas pela superfície da



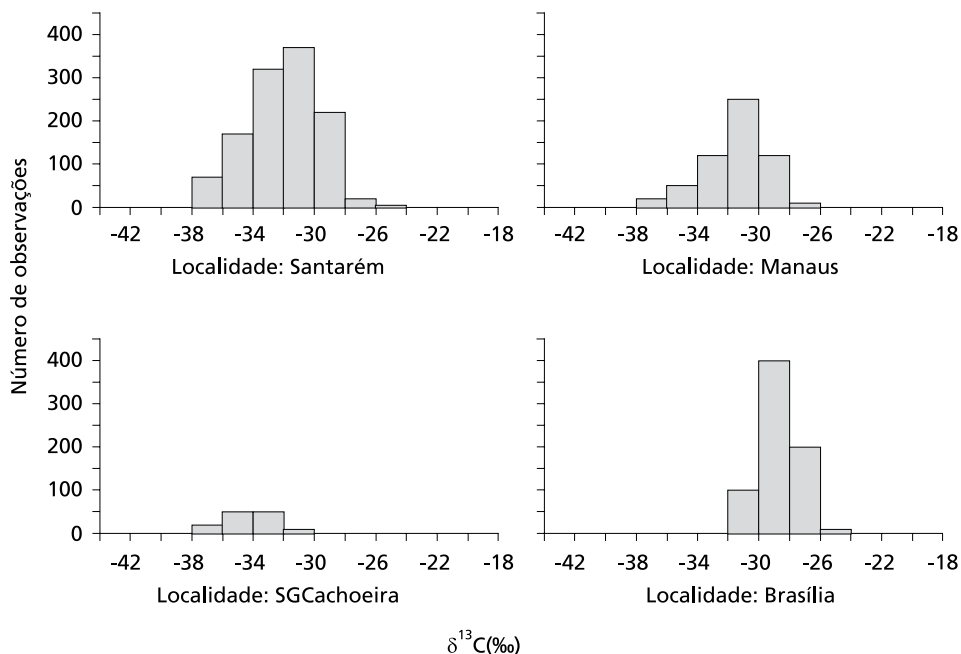


Fig. 4.1 Distribuição de frequência dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ de folhas de espécies arbóreas coletadas em diferentes localidades

Fonte: Ometto et al., 2006.

oceano-atmosfera no Cap. 3, o fracionamento dessa reação é de aproximadamente -8‰ à temperatura de 20°C ;

c) durante a carboxilação do HCO_3^- . No ciclo fotossintético das plantas C_4 , o HCO_3^- será fixado como molécula orgânica, e não o CO_2 . O fracionamento isotópico durante a fixação do bicarbonato é menor que o fracionamento durante a fixação do CO_2 . Como vimos, o valor **b** foi igual a 30‰ ; no caso das plantas C_4 , o valor calculado (denominado **b₄***) será igual a 2‰ . Portanto, o fracionamento total em uma planta C_4 , denominado **b₄**, será igual a:

$$b_4 = e_b + b_4^* \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Numericamente, **b₄** será igual a $-8 + 2 = -6\text{‰}$;

d) durante o “vazamento” do CO_2 e do HCO_3^- . Uma certa proporção dessas duas espécies carbonatadas pode vazar do mesófilo e seguir os mesmos caminhos bioquímicos em relação às plantas C_3 . Nesse caso, o fracionamento volta a ser de 30‰ (o valor **b**). No entanto, como somente uma certa proporção das



espécies carbonatadas vaza do mesófilo, esse tipo de fracionamento é comumente expresso como uma proporção do valor **b**, em geral expressa como: $\phi \cdot b$, onde ϕ exprime a proporção de espécies carbonatadas que vaza do mesófilo. É importante notar que, para a maioria das espécies de plantas C_4 , essa proporção encontra-se em torno de 34%.

Computando-se todas essas etapas, a equação que exprime o fracionamento isotópico em plantas C_4 passa a ser:

$$\Delta = a + (b_4 + b_3 \cdot \phi - a) \cdot \frac{P_i}{P_a} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

Utilizando-se a notação δ , teremos:

$$\delta^{13}C_{\text{planta}-C_4} = \delta^{13}CO_2 - a - (b_4 + b_3 \cdot \phi - a) \cdot \frac{P_i}{P_a} \quad (\text{Eq. 4.8})$$

De acordo com Farquhar, Ehleringer e Hubick (1989), geralmente o termo $(b_4 + b_3 \cdot \phi - a)$ é igual a zero, pois, como citado anteriormente, a proporção ϕ encontra-se em torno de 34%. Dessa forma, a Eq. 4.8 resultará em:

$$\delta^{13}C_{\text{planta}-C_4} = \delta^{13}CO_2 - a \quad (\text{Eq. 4.9})$$

Pela Eq. 4.9, nota-se que, especificamente para as plantas que seguem o ciclo fotossintético C_4 , a relação p_i/p_a não terá influência na composição isotópica desse tipo de planta.

A Fig. 4.2 mostra os valores de $\delta^{13}C$ de gramíneas tropicais depositadas até 1974 no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Um grupo de gramíneas segue o ciclo fotossintético C_3 , com valores característicos de $\delta^{13}C$ entre -35‰ e -23‰ . Por outro lado, um outro grupo de gramíneas segue o ciclo fotossintético C_4 , com valores entre -15‰ e -9‰ .

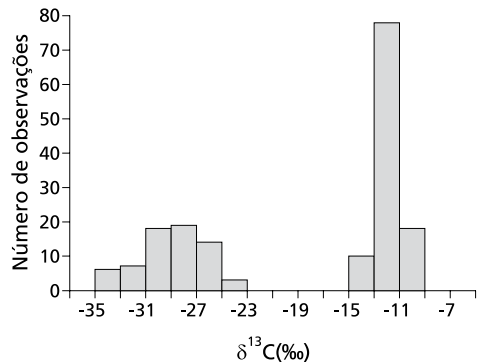


Fig. 4.2 Distribuição de freqüência dos valores de $\delta^{13}C$ de amostras de gramíneas depositadas até 1974 no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Fonte: Medina et al., 1999.

6 A composição

isotópica dos solos

6.1 INTRODUÇÃO

Examinando-se os valores de $\delta^{13}\text{C}$ da matéria orgânica do solo (MOS) ao longo de uma transeção realizada no Pantanal, na Fazenda Nhumirim, pertencente à Embrapa (Victoria *et al.*, 1995), nota-se que eles seguiram os valores isotópicos da vegetação presente. Na parte da transeção dominada por gramíneas (0 a 350 m), os valores de $\delta^{13}\text{C}$ da MOS foram próximos dos valores isotópicos das gramíneas C_4 , enquanto na parte dominada por plantas C_3 , os valores tornaram-se próximos da composição isotópica dessas plantas (Fig. 6.1).

O fato mais relevante que observamos na Fig. 6.1 é que “o solo tende a ter uma composição isotópica similar à cobertura vegetal presente”.

Percebe-se também que existe uma certa variabilidade na composição isotópica desses solos, provavelmente um reflexo da variabilidade existente na composição isotópica da vegetação presente, bem como do fracionamento isotópico envolvido no processo de decomposição do material vegetal no solo.

Nas áreas florestais, notamos que o $\delta^{13}\text{C}$ da MOS é sempre maior que o $\delta^{13}\text{C}$ da vegetação. Esse fato indica que entre a vegetação e o solo ocorre uma perda preferencial de átomos de ^{12}C . Estudos mostram que, durante a decomposição do tecido vegetal, ocorre um enriquecimento em torno de 1 a 2‰. A Fig. 6.2 mostra essa tendência com dados de um estudo conduzido pelo

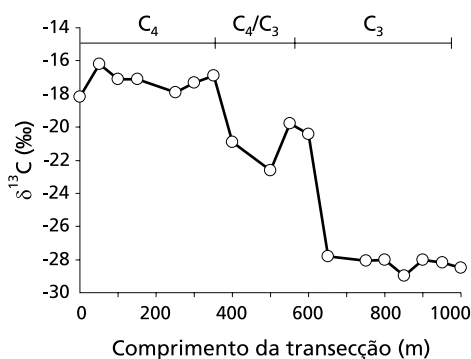


Fig. 6.1 Valores de $\delta^{13}\text{C}$ da matéria orgânica do solo ao longo de uma transeção, com predomínio de uma área de gramíneas C_4 , seguida por uma área de transição com mistura entre plantas C_3 e C_4 e terminando em uma área dominada por plantas arbóreas que seguem o ciclo fotossintético C_3 . Fazenda Nhumirim, Embrapa, Pantanal Mato-grossense

Fonte: adaptado de Victoria *et al.*, 1995.





profundidade é maior que 3 a 4‰, é provável que tenha havido uma mudança no tipo de vegetação durante a pedogênese desses perfis. Exemplo disso é a substituição de uma floresta, predominantemente do tipo C_3 , por uma savana onde as espécies de gramíneas estabelecidas tenham sido predominantemente do tipo C_4 . Esse é o caso dos perfis de solos coletados próximo às cidades de Piracicaba (SP) e Londrina (PR) (Fig. 6.3).

Por outro lado, em solos onde dominam campos naturais de gramíneas do tipo C_4 , a variação dos valores de $\delta^{13}C$ com a profundidade do solo é distinta em relação às florestas, ocorrendo conforme a dinâmica da vegetação precedente. Geralmente há dois tipos de perfis: (1) aqueles onde por muito tempo a vegetação dominante é composta por gramíneas (Fig. 6.4); e (2) aqueles onde atualmente dominam as gramíneas, mas antigamente dominava uma vegetação composta por plantas C_3 , ou uma mistura de plantas C_3 e C_4 (Fig. 6.5).

Na Fig. 6.4, nota-se que no perfil do solo sob floresta houve um discreto aumento nos valores de $\delta^{13}C$, em torno de 3 a 4‰, sugerindo que esse sítio tem uma cobertura florestal há longo tempo. Por outro lado, no perfil de solo sob savana, nota-se uma diminuição de cerca de 6‰ entre a camada mais superficial e a mais profunda, sugerindo que a savana predominante em tempos remotos era mais arbustiva (plantas do tipo

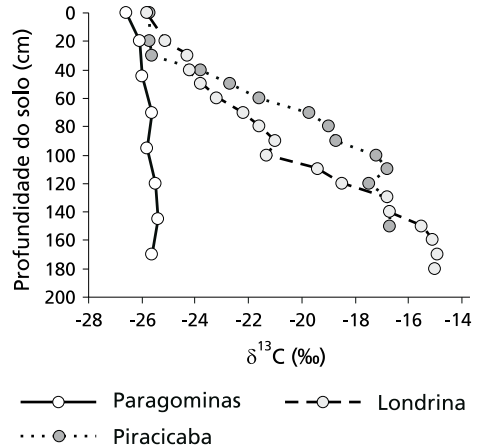


Fig. 6.3 Variação dos valores de $\delta^{13}C$ da matéria orgânica do solo sob floresta com a profundidade do perfil em três localidades distintas
Fonte: adaptado de Martinelli et al., 1996a.

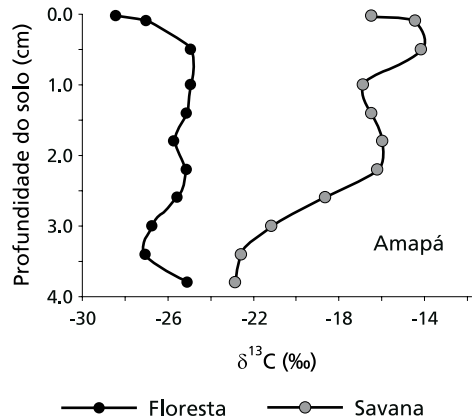


Fig. 6.4 Variação dos valores de $\delta^{13}C$ da matéria orgânica do solo sob floresta (círculo preto) e savana (círculo cinza) em relação à profundidade de perfis de solos coletados no Amapá
Fonte: adaptado de Saniotti et al., 2002.



devido ao caminho metabólico que o alimento percorre antes de ser incorporado em algum tecido (Fig. 9.1).

Os isótopos são fracionados nos tecidos animais em função de sua atividade metabólica. Por exemplo, o fígado tem uma função metabólica totalmente distinta daquela de um músculo. Portanto, não podemos comparar diretamente a composição isotópica do fígado com a do músculo, pois certamente o fracionamento isotópico entre a dieta e esses dois tecidos será distinto. Por exemplo, o fracionamento isotópico entre a ração fornecida a porcos e a cartilagem, o pêlo e as unhas dos animais foi menor que 1‰, enquanto entre a ração e os tecidos metabólicos, como os músculos e o fígado, variou entre 1,5‰ e 2‰ (Fig. 9.1).

Se a composição isotópica da fonte alimentar de um determinado organismo varia sazonalmente, pode existir o problema da “memória isotópica”, ou seja, quanto tempo leva para que o carbono ou o nitrogênio fixado a partir de uma fonte alimentar em um determinado período sejam substituídos pela nova fonte alimentar? Por exemplo, o tambaqui, uma espécie nobre de peixe que habita a bacia amazônica, alimenta-se de frutos e sementes na época em que rios e lagos estão cheios, e basicamente de fitoplânctons quando rios e lagos estão vazios. Como a composição isotópica de frutos e sementes é distinta da composição isotópica do fitoplâncton, podemos utilizar a metodologia isotópica para estudar a nutrição do tambaqui. Vamos supor que o período de cheia dure 4 meses na Amazônia e que o período de águas baixas também dure 4 meses. Caso exemplares de tambaqui sejam amostrados logo no início do período de cheia, provavelmente o carbono ou o nitrogênio de seus tecidos sejam do período de águas baixas. Portanto, seria prudente que os exemplares fossem capturados no final do período de cheia para garantir que a maioria do carbono adquirido já esteja incorporado no tecido dos peixes.

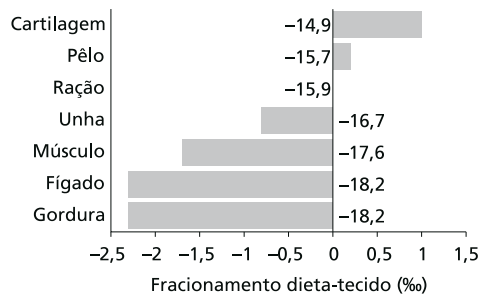
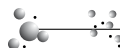


Fig. 9.1 Fracionamento isotópico médio entre a ração (dieta) e vários tecidos de cinco porcos criados e abatidos pelo Departamento de Zootecnia dos Animais Não-Ruminantes da Esalq. Os valores próximos às barras representam os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ de cada tecido e da ração. Por exemplo, o fracionamento entre a ração e o fígado foi obtido por $\delta^{13}\text{C}_{\text{fígado}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{ração}}$, ou seja, $-18,2 - (-15,9) = 2,3$

Fonte: Nardoto et al., 2006.



mente importantes para determinar a posição de um dado organismo na cadeia trófica a que pertence.

9.6 ESTUDO DE CASOS

9.6.1 NUTRIÇÃO ANIMAL

Nutrição de animais domésticos com alternância de C_3 e C_4

Jones *et al.* (1979) realizaram uma série de experimentos com diferentes animais, alternando sua alimentação com plantas C_3 e C_4 . No primeiro experimento, eles forneceram dietas puras de C_3 e C_4 . Como esperado, os animais tiveram valores de $\delta^{13}C$ das fezes próximos ao valor isotópico das respectivas dietas (Tab. 9.2).

Tab. 9.2 Valores de $\delta^{13}C$ de alimentos e fezes de carneiro e bovinos alimentados com leguminosas C_3 e gramíneas C_4

Alimentação	Alimento	Fezes-carneiro	Fezes-bovino
C_3	-23,5	-21,2	
C_3	-26,6		-24,2
C_4	-13,1	-13,5	-14,0

Fonte: adaptado de Jones *et al.*, 1979.

Apesar de próximos, os valores de $\delta^{13}C$ não foram iguais. No caso de animais alimentados com plantas C_3 , o valor das fezes foi cerca de 2,4‰ maior que o da alimentação, mas não houve diferença estatística entre os valores de $\delta^{13}C$ das fezes dos animais alimentados por C_4 e os da dieta. Os autores atribuíram essas discrepâncias a um sinal remanescente da dieta anterior, que era exclusivamente de plantas C_4 , ou seja, atribuíram-nas à “memória isotópica” que discutimos no início deste capítulo.

No segundo experimento, houve mudanças abruptas de dietas puras de C_3 para dietas puras de C_4 , e vice-versa (Fig. 9.3). Observamos que as fezes, em cerca de 6 dias, estabilizaram seus valores isotópicos em torno dos valores de $\delta^{13}C$ da alimentação fornecida. Em seguida, no terceiro experimento, em uma dieta exclusivamente de plantas C_3 , fizeram-se adições crescentes de plantas leguminosas que seguem o ciclo C_3 . Nota-se que, com o aumento da