



ISÓTOPOS FORENSES

TIRAGEM CONTROLADA

Este livro só pode ser comercializado com o selo de controle de tiragem numerado e rubricado pelo detentor do direito autoral

GABRIELA B. NARDOTO
RODRIGO R. MAYRINK
CRISTINA B. BARBIERI
FÁBIO J. V. COSTA
ORGANIZADORES

ISÓTOPOS FORENSES

Autores:

ALEXANDRE B. GONTIJO	LUIZ A. MARTINELLI
ANDRÉ C. PEREIRA	LUIZA B. R. PEREIRA
ANELIZE M. B. RUMBELSPERGER	MARCELO C. LASMAR
ANTONIO C. G. JARDIM	MARCUS V. DE O. ANDRADE
CAMILLA V. KAFINO	MARIA A. CORREIA
CARLOS E. DE REZENDE	MURILO Q. R. BASTOS
CARLOS E. S. DE OLIVEIRA	PAULO G. CELSO
CLÁUDIA R. PLENS	PLINIO B. DE CAMARGO
CLAUDIO DE M. VALERIANO	ROBERTO V. SANTOS
FÁBIO A. DA S. SALVADOR	SASHA T. HART
JOÃO P. SENA-SOUZA	SUSIANE LEONARDELLI
JORGE M. DE FREITAS	TIAGO B. KISAKA
JULIANA C. DENADAI	VERIDIANA T. DE S. MARTINS
LÍVIA M. BORGES	VLADIMIR E. COSTA
LUCIANO O. VALENZUELA	

Série – Novas Fronteiras

JESUS ANTONIO VELHO

CAMPINAS/SP



2022

Uma breve história da metodologia isotópica

1

LUIZ ANTONIO MARTINELLI
CARLOS EDUARDO DE REZENDE
GABRIELA BIELEFELD NARDOTO
ANTONIO CELSO JARDIM

No começo do século XIX, o átomo já era relativamente bem conhecido, ainda que pouco se soubesse sobre partículas subatômicas. Ernest Rutherford, em 1911, propôs um modelo atômico que incluía a existência de um núcleo denso e partículas negativas girando ao redor desse núcleo. Dois anos após, Frederick Soddy, químico inglês, trabalhando com elementos radioativos, notou que havia diferenças de massa entre núclídeos pequenas demais para diferenciá-los entre dois elementos, mas suficientemente grandes para prever átomos com características químicas muito semelhantes e com massas um pouco distintas. A esses, Soddy deu o nome de *isótopos*, por ocuparem o mesmo lugar na tabela periódica criada em 1869 por Dmitri Mendeleev.

No início da década de 1910, Thompson e Aston aprofundaram o conhecimento sobre isótopos, aperfeiçoando um primeiro espectrógrafo criado por Thompson. Após a primeira grande guerra mundial, a dupla já tinha descrito mais de 200 isótopos, tanto radioativos como estáveis. Esses pesquisadores buscavam conhecimento mais detalhado sobre novos elementos e seus isótopos, principalmente sobre a estrutura dos átomos e a determinação da massa de cada núclídeo recém-descoberto. O fim da década de 1920 e início da década de 30 foi particularmente importante para o estudo dos isótopos estáveis dos elementos leves, pois foram descobertos, em 1929, o ^{18}O , ^{13}C e ^{15}N .

Em 1930, Harold Urey, considerado um dos fundadores da metodologia isotópica, descobre o ^2H [1]. Em 1935, Urey e Greiff publicam um artigo seminal demonstrando equações básicas de equilíbrio isotópico em

inúmeras reações importantes e, pela primeira vez, se explica o fracionamento ou discriminação isotópica [2].

1. Carbono

No final da década de 1930, no prelúdio da segunda grande guerra mundial, Alfred Nier, juntamente com Earl Gulbransen, publicam um artigo onde analisam a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em vários tipos de amostras, como rochas ígneas, calcárias, plantas, ar atmosférico e a parte mole de um molusco [3]. Nier e Gulbransen, pela primeira vez, notaram que havia uma grande variação na razão isotópica das amostras e que amostras compostas por carbono inorgânico tendiam ao enriquecimento em ^{13}C , enquanto amostras compostas por carbono orgânico tendiam ao empobrecimento desse isótopo.

Baseando-se nas variações observadas, esses autores concluíram que, a despeito do número incipiente de determinações, a razão isotópica do carbono dependia de como um composto havia sido formado e sugeriram que as variações encontradas poderiam se tornar um novo método para se determinar a origem de compostos de carbono na natureza. Com base nessa previsão, é justo atribuir a esse artigo o nascimento do uso da razão isotópica de elementos estáveis como um método de estudo sobre a natureza e os ambientes de formação de compostos orgânicos e inorgânicos, ou seja, a metodologia isotópica. A partir dessa publicação, a razão isotópica dos elementos estáveis passou a ser uma ciência aplicada, extrapolando áreas específicas, como a Física e a Química, para se tornar uma ferramenta de uso comum em diversas áreas do conhecimento.

Um passo fundamental para a popularização da metodologia isotópica foi o aperfeiçoamento dos espectrômetros de massas, mais especificamente dos espectrômetros de massa de razão isotópica (*isotope-ratio mass spectrometers* – IRMS), que são um tipo de espectrômetro concebido para medir a abundância relativa de isótopos – ou razão isotópica – em determinado tipo de amostra. O responsável por esse aperfeiçoamento foi Alfred Nier, estabelecendo um novo ângulo de curvatura de 60° para deflexão dos íons.

Além da mudança no ângulo, Nier também introduziu um duplo coletor, que permitia a medida simultânea de dois isótopos e um sistema de dupla entrada (*dual inlet*) e possibilitava a determinação da abundância

isotópica na amostra e no padrão. Ainda hoje essa é a técnica de medida mais utilizada e permitiu a construção de espectrômetros mais precisos e sua comercialização, propiciando que instituições de pesquisa não especializadas nessa técnica passassem a medir a abundância isotópica para fins aplicados.

Se, por um lado, o artigo publicado por Nier e Gulbransen [3] consolidou as bases da metodologia isotópica, o aperfeiçoamento dos IRMS por Nier no fim da década de 1940 foi fundamental para o avanço da metodologia isotópica no mundo. Em 1950, McKinney, do grupo de Harold Urey, da Universidade de Chicago, publicou um artigo cujo principal objetivo era a melhoria das medidas sobre abundância isotópica por IRMS com a precisão que se fazia necessária para a medida de pequenas diferenças que ocorrem na natureza [4]. Além de sua relevância prática, esse artigo tem valor histórico por expressar, pela primeira vez, a razão isotópica de uma amostra na forma de desvio em relação a um padrão estabelecido. Esse desvio foi representado pela letra grega delta (δ), de acordo com a equação:

$$\delta = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}} - 1),$$

sendo o resultado multiplicado por 1000, onde R_{amostra} representa a razão isotópica da amostra e $R_{\text{padrão}}$, a razão isotópica de um padrão estabelecido.

Com a evolução da técnica isotópica, vários padrões comuns foram estabelecidos, como o carbonato de cálcio – Chicago PDB¹, estabelecido pelo grupo de Urey para carbono; o ar atmosférico no caso do nitrogênio; e a água do mar (VSMOW – Vienna Standard Mean Ocean Water²) para oxigênio e deutério.

Em 1951, Samuel Epstein, juntamente com Urey e outros colaboradores, demonstrou que a razão isotópica do oxigênio variava com a temperatura da água do mar [5]. Essa variação foi então utilizada para se determinar a temperatura da água quando da formação de carbonatos biogênicos encontrados em moluscos, determinando-se a razão isotópica do oxigênio desses carbonatos.

1 Ver, a respeito, Capítulo 2 – Princípios Básicos sobre Isótopos Estáveis.

2 Ver, a respeito, Capítulo 2 – Princípios Básicos sobre Isótopos Estáveis.

No ano seguinte, Wickman determinou a razão isotópica de plantas de um museu sueco, incluindo plantas da Mata Atlântica e da Amazônia Peruana [6]. Observou uma grande variação entre as plantas, principalmente entre aquelas oriundas de desertos e de florestas tropicais. É importante lembrar que o metabolismo fotossintético das plantas, tanto do tipo C_3 como C_4 , só seria definitivamente determinado no fim dos anos 1950 e 60, respectivamente. Sem esse conhecimento, Wickman atribuiu o enriquecimento em ^{13}C das plantas C_4 em relação às plantas C_3 ao fato de a absorção de CO_2 oriunda de solos calcários ser mais intensa no tipo C_4 .

Por outro lado, a diferença entre as plantas C_3 foi por sua vez atribuída à *intensidade* na ciclagem de CO_2 entre desertos e florestas tropicais, sem uma definição clara sobre o entendimento do autor sobre o termo *intensidade*. Contudo, Wickman fez uma previsão bastante pertinente ainda para os dias de hoje, pressupondo que as condições ambientais seriam mais importantes do que a similaridade genética entre as plantas. De acordo com suas palavras: “*The variations in the isotope ratio of carbon is thus not primarily a problem of systematic botany but of ecology. In order to study the influence of the various factors in natural surroundings, ecologists and physiologists probably have to cooperate. This is especially important in testing the observed anomaly by gymnosperms*”.

Logo no ano seguinte, Harmond Craig publica um artigo que se torna um dos clássicos sobre isótopos de carbono e onde são analisadas centenas de amostras, dentre rochas e organismos [7]. Os resultados do autor confirmaram resultados anteriores, ou seja, compostos contendo carbono inorgânico tendem a ser enriquecidos em ^{13}C . Nas palavras de Craig: “*These results indicate that original differences are due to some sort of vital effect of the organism*”. Ele também notou que não havia um controle genético acentuado sobre valores de $\delta^{13}C$, mostrando que a composição isotópica de uma mesma espécie variava entre locais distintos.

Em especial, a composição isotópica da amostra 125 chamou a atenção do autor por ser enriquecida em ^{13}C se comparada a outras plantas. Craig notou que a planta era uma gramínea que vivia em solo rico em carbonato e, como Wickman, levantou a hipótese de que, de alguma forma, o carbono constituinte do carbonato, enriquecido em ^{13}C , estava sendo incorporado por essas plantas. Com este achado, Craig demonstrou que a *intensidade* da ciclagem do CO_2 explicaria a variação na composição isotópica das plantas, levantando uma nova hipótese,

bem mais próxima da realidade atual: *“Since the terrestrial plants are found to be lighter than atmospheric carbon dioxide by some 18‰, we see that they carry on a separation of isotopes by some mechanism. We may ask if the observed separation can be explained by a physical or kinetic process, or if it is necessary to postulate some near-equilibrium biochemical mechanism operating during photosynthesis”*.

Ao longo da década de 1950, Calvin e Benson publicaram uma série de artigos onde todo o metabolismo fotossintético das plantas C₃ foi finalmente desvendado. Baseando-se nesses achados, Samuel Epstein e seu aluno Park publicaram, em 1960, o artigo intitulado *“Carbon isotopic fractionation during photosynthesis”* [8]. Nesse artigo, pela primeira vez, os autores reconhecem que o fracionamento isotópico durante a fotossíntese ocorre em duas etapas. A primeira, na passagem do CO₂ da atmosfera para o interior da planta e, a segunda, na conversão do CO₂ em 3-ácido fosfoglicérico, o primeiro composto orgânico formado.

Os autores também previram que o fracionamento isotópico entre CO₂ atmosférico e o composto orgânico fotossintetizado dependia da concentração do primeiro, fato confirmado por Farquhar, O’Leary e Berry em 1982, quando foi publicado um modelo que relaciona a composição isotópica das plantas C₃ com a razão entre a concentração de CO₂ no interior da câmara estomatal (p_i) e a concentração de CO₂ atmosférica (p_a) através da seguinte equação:

$$\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{CO}_2 - a - (b - a) p_i/p_a$$

Onde:

$\delta^{13}\text{CO}_2$ é a composição isotópica do CO₂ atmosférico;

a é o fator de fracionamento referente à passagem do ar da atmosfera para a câmara estomática (4‰);

b é o fracionamento referente ao ciclo bioquímico fotossintético das plantas C₃ (30‰) [9].

No fim da década de 1960, Margareth Bender publicou um artigo onde mostrava que a composição isotópica das plantas C₄ era realmente distinta das plantas C₃, independentemente de terem crescido sobre solos calcários, jogando por terra as hipóteses iniciais de Wickman e Craig. Baseando-se no artigo de Hatch *et al.* [10], que descreveram diferenças importantes no metabolismo fotossintético das plantas C₄ em relação às plantas C₃, Bender [11] sugeriu que a composição isotópica das plantas C₄

seria resultante dessas diferenças entre metabolismos fotossintéticos. Em 1983, Farquhar publica então o artigo intitulado “*On the nature of carbon isotope discrimination in C_4 species*” [12], no qual demonstra que a composição isotópica das plantas C_4 não dependia da razão p_i/p_a , como era o caso das plantas C_3 ; portanto, tanto as condições ambientais quanto a luminosidade e a disponibilidade de água interferiam menos na composição isotópica das plantas C_4 comparado às plantas C_3 .

Nos últimos anos da década de 1980, Farquhar, Ehleringer e Hubick publicaram um extenso artigo de revisão sobre o efeito da fotossíntese na composição isotópica de vários tipos de plantas (o artigo tem atualmente mais de 7000 citações em *Web of Science*) [13]. Nesse artigo, os autores demonstraram como a abertura e fechamento dos estômatos pelas plantas C_3 – que, por sua vez, seriam controlados pela necessidade que as plantas têm de maximizar os ganhos fotossintéticos, minimizando as perdas de água – seriam determinantes na composição isotópica das plantas.

Nas décadas seguintes, o modelo proposto por Farquhar *et al.* [14] foi testado em inúmeros experimentos e tem resistido à prova do tempo. Portanto, ao longo de pelo menos 40 anos, no período de aproximadamente 1940 a 1980, foram produzidos experimentos e estudos e publicados artigos que demonstraram que a composição isotópica do carbono variava na natureza. Em seguida, demonstrou-se que havia uma diferença na composição isotópica entre as plantas C_3 e C_4 , e que as variações na composição isotópica das plantas C_3 tinham menos um controle genético e mais um controle ambiental, principalmente quanto à disponibilidade de água e à luminosidade. Dessa forma, tinha sido então vencida uma primeira etapa que permitiria uma explosão do uso da composição isotópica para as mais diversas aplicações. Ainda antes de se conhecer definitivamente as causas para as variações isotópicas entre as plantas C_3 e C_4 , vários autores já aplicavam essa distinção de diferentes formas. Por exemplo, desde a década de 1950 uma série de artigos sobre a composição isotópica, principalmente de sedimentos marinhos modernos e antigos, foram publicados. Por outro lado, somente no início da década de 1970 foram publicadas as primeiras determinações sobre a composição isotópica da matéria orgânica do solo, demonstrando que a composição da matéria orgânica do solo refletia a sua cobertura vegetal.

No Brasil, os primeiros dados isotópicos sobre matéria orgânica do solo foram publicados em 1985 por Carlos Cerri e colaboradores na

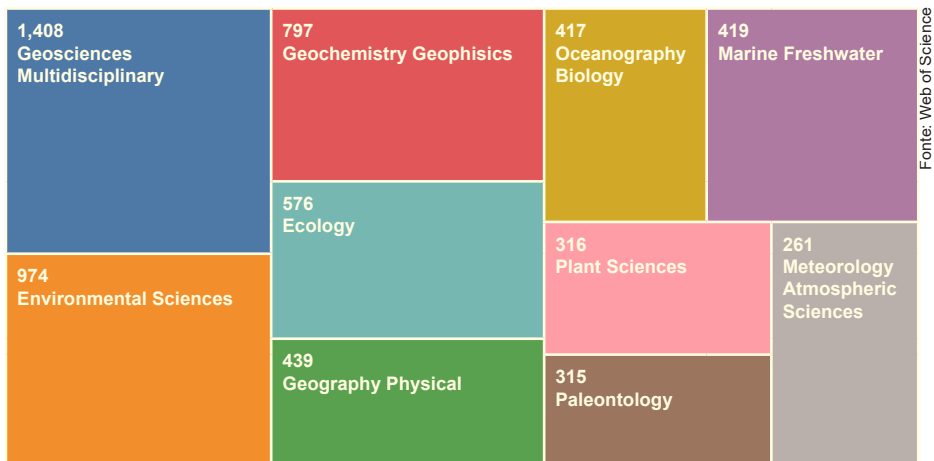
Comptes rendus de l'Académie des Sciences, com o artigo intitulado “*Application du traçage isotopique naturel em C-13, a letude de la matière organique dans les sols*” [15]. Nesse artigo é descrita a evolução temporal da composição isotópica da matéria orgânica do solo quando da substituição de florestas nativas por canaviais na região de Piracicaba, no interior do estado de São Paulo.

As primeiras aplicações forenses usando a razão isotópica de carbono foi com a publicação do artigo de White e Doner [16], do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, onde determinaram a composição isotópica em mel de abelha, diferenciando amostras que teriam sido “batizadas” com xarope de frutose de milho.

No fim da década de 1970, dois acadêmicos sul-africanos foram, provavelmente, os primeiros a aplicarem a composição isotópica do carbono em estudos sobre a dieta de populações pretéritas da região leste dos Estados Unidos, que, após a introdução do milho, por volta do ano 1000 AD, teve crescente aumento nos valores de $\delta^{13}\text{C}$, resultante do aumento no consumo de milho por essas populações pretéritas [17]. A partir de então, o uso de isótopos estáveis em arqueologia se tornou cada vez mais comum.

Da mesma forma, ao longo da década de 1980, após Michael DeNiro e seu orientador Samuel Epstein [18] publicarem artigo demonstrando que para carbono havia um fracionamento entre 0 e 1‰ entre dieta e consumidor, estudos nessa linha literalmente explodiram em publicações em várias partes do mundo.

Um levantamento feito na *Web of Science* utilizando como critério de busca *stable carbon isotop* demonstra o quanto várias áreas do conhecimento utilizam a composição isotópica do carbono em diversos tipos de investigação. No período de 70 anos, de 1950 a 2020, foram publicados cerca de 23.000 trabalhos, sendo que cerca da metade se refere às áreas de ciências ambientais e ecologia (Quadro 1). De 1950 a 2000, somente 20% desse total haviam sido publicados, significando que 80% dos artigos sobre isótopos estáveis do carbono foram publicados nos últimos 20 anos (Figura 1). A inflexão nesta curva de publicações iniciada no fim da década de 1980 e posteriormente ampliada na década seguinte é fruto na melhoria dos procedimentos para tratamento das amostras, seguida de uma evolução substancial nos equipamentos para as determinações analíticas.



Quadro 1 – Número de artigos publicados em distintas áreas da ciência de 1950 a 2020 empregando como método de estudo a composição isotópica do carbono.

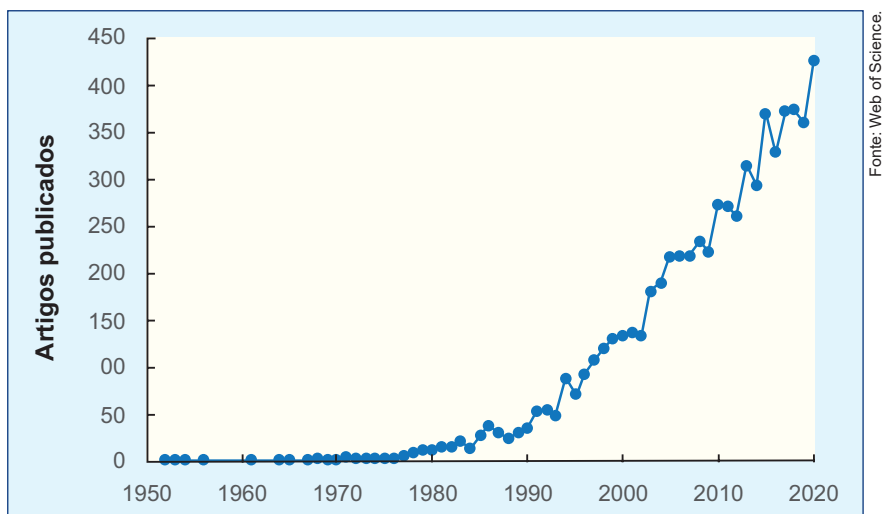


Figura 1 – Evolução temporal do número de artigos publicados por ano, entre 1950 e 2020, utilizando a composição isotópica do carbono como método de estudo.

2. Nitrogênio

No começo da década de 1930, Urey mediu pela primeira vez a abundância relativa entre ^{14}N e ^{15}N no ar atmosférico, estabelecendo que para um átomo de ^{14}N haveria 0.00288 átomos de ^{15}N [19]. Na década de 1950, Hoering [20], utilizando a notação δ e assumindo o ar atmosférico como

padrão, a razão $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ foi determinada em vários materiais. Em seu artigo, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas variaram de -6,5 a 8,1%, enquanto os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de tecidos animais foram todos positivos, variando de 4,5 a 7,5%. Ainda que este artigo tenha sido o primeiro a medir a razão isotópica em organismos, seu intuito maior foi puramente técnico, enfatizando que a técnica estava pronta para ser empregada. No fim da década de 1950 foi publicado um artigo não apenas metodológico, mas, sim, interpretativo, sobre os efeitos da fixação de nitrogênio atmosférico por bactérias (*Azotobacter*) na razão isotópica $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ [21]. Esses autores concluíram que os organismos modificavam a razão isotópica conforme o nitrogênio ciclava na natureza, posto que haviam sido observadas diferenças consistentes entre a razão isotópica de vários organismos. Já no começo da década de 1960 foram publicados pela primeira vez valores de $\delta^{15}\text{N}$ de solos, notando os autores que esses valores variavam conforme o tipo de solo e a profundidade e forma do nitrogênio [22]. No entanto, o principal objetivo desse artigo foi alertar o quanto essas variações naturais em solos poderiam interferir em experimentos que utilizassem materiais enriquecidos em átomos de ^{15}N como traçadores.

Foi somente no início da década seguinte que Delwiche e Steyn [23] publicaram o primeiro artigo interpretativo sobre as variações dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ em solos, principalmente à luz do papel que os microrganismos teriam no fracionamento isotópico de espécies inorgânicas de N. Os autores demonstraram que um pequeno fracionamento isotópico ocorria no processo de fixação simbiótica do nitrogênio, mas que um grande fracionamento ocorria no processo de nitrificação, com o substrato (amônia) se tornando enriquecido em átomos de ^{15}N . Chegaram à conclusão de que: *“These results suggest that it might be possible to determine the source of nitrogen in plants under field conditions and to evaluate the extent to which the fixation of atmospheric nitrogen may be contributing to the total nitrogen of an ecosystem”*.

Em meados da década de 1970 já havia um número de artigos suficiente para se concluir que a discriminação biológica enriquecia em ^{15}N o substrato em menor grau, como era o caso da fixação simbiótica de N e, em maior grau, em reações ligadas aos processos de nitrificação e desnitrificação. Havia também um razoável número de artigos que demonstravam consistentemente valores positivos de $\delta^{15}\text{N}$ nos solos e que havia um enriquecimento em ^{15}N com a profundidade. Esses autores também sugeriram que a razão isotópica do nitrogênio das plantas poderia ser

utilizada como um indicador da presença de nitrogênio fixado da atmosfera, mediante a pequena discriminação nesse processo e o valor de $\delta^{15}\text{N}$ relativamente constante do N_2 atmosférico (0‰) e geralmente menor que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ do solo (> 0‰).

Seguiram-se estudos sobre a composição isotópica de plantas, tanto fixadoras como não fixadoras. Heaton [24] foi provavelmente o primeiro a mostrar que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas decresciam com o aumento de precipitação, dando início a uma série de estudos que buscavam entender a influência de fatores climáticos sobre a composição isotópica das plantas. Concluiu que: *“The high ^{15}N contents for plants in coastal, saline and arid environments is presumed to reflect the influences of these environments on the isotopic composition of nutrient nitrogen in the soil, rather than on the effects of isotopic fractionation within plants”*.

No fim da década de 1980, Vitousek *et al.* [25] publicaram os primeiros valores de $\delta^{15}\text{N}$ em plantas tropicais do Hawái, enfatizando a possibilidade de se usar a razão isotópica das plantas ao longo de gradientes de disponibilidade de nitrogênio. Durante toda a década de 80 e no início da década de 90, uma série de artigos sobre a razão isotópica de plantas foram publicados e alicerçaram o uso desse isótopo em estudos de fisiologia, fontes de N para as plantas e disponibilidade de N.

As primeiras tentativas de se utilizar a razão isotópica do nitrogênio envolvendo animais e a origem de suas dietas não foram muito animadoras, à primeira vista por conta da complexidade metabólica relacionada ao ciclo da ureia nos animais. No entanto, no início da década de 1980, DeNiro e Epstein [26] demonstraram o enriquecimento isotópico em ^{15}N ao longo da cadeia trófica e Minagawa e Wada [27] mostraram que o fracionamento isotópico ao longo da cadeia trófica tinha um valor relativamente constante em torno de 3‰, alicerçando o uso destes isótopos em estudos sobre dietas em animais.

Ainda na década de 1980, Schoeninger *et al.* [28] publicaram provavelmente o primeiro artigo utilizando a razão isotópica do nitrogênio em colágeno de restos mortais de seres humanos pré-históricos. Foi nesta década que também começaram a surgir os primeiros estudos utilizando conjuntamente as razões isotópicas de carbono e nitrogênio nas investigações sobre a estrutura das cadeias tróficas, dando início a uma área intensamente explorada até os dias de hoje.

3. Oxigênio e hidrogênio

O isótopo de massa 2 do hidrogênio (deutério) foi descoberto por Urey [1]. O fato da magnitude do fracionamento isotópico entre ^{18}O e ^{16}O depender da temperatura do meio, Urey *et al.* [29] propuseram o uso da razão isotópica do oxigênio como um paleotermômetro, determinando a razão isotópica do oxigênio do carbonato presente nas conchas de animais depositados no fundo do oceano há milhares de anos. A suposição básica seria a de que a razão isotópica do oxigênio do carbonato estaria em equilíbrio isotópico e, portanto, representaria a composição isotópica da água do oceano quando a carapaça do animal foi formada.

No entanto, não havia ainda um número significativo de determinações da razão isotópica de oxigênio em amostras de água. Em 1953, Epstein e Maeda começaram a preencher essa lacuna em um estudo exploratório, onde foram determinados os valores de $\delta^{18}\text{O}$ em várias amostras de águas continentais e oceânicas de diferentes partes do globo [30]. Esses autores demonstraram uma larga variação nos valores de $\delta^{18}\text{O}$, principalmente de água continental, e concluíram preliminarmente que essa variação dependia das fontes dessas águas.

No mesmo ano, Irving Friedman aperfeiçoou métodos e passou a determinar valores de δD com maior precisão, tornando essas determinações rotineiras em laboratórios de espectrometria de massas leves [31]. Além disso, determinou valores de $\delta^{18}\text{O}$ de amostras de águas continentais e oceânicas de várias partes do mundo, encontrando uma larga variação nos valores e uma relação constante entre $\delta^{18}\text{O}$ e δD . Nos anos seguintes, foram-se ampliando essas determinações e com isso demonstrando que valores de $\delta^{18}\text{O}$ de águas continentais eram realmente menores em regiões mais frias, confirmando os achados pioneiros de Urey de que o fracionamento isotópico durante a condensação do vapor d'água seria maior em regiões frias.

As primeiras medidas de $\delta^{18}\text{O}$ e δD em amostras de precipitação foram feitas por Harmond Craig, que demonstrou haver uma grande variação nos valores isotópicos, mas que havia uma relação constante entre $\delta^{18}\text{O}$ e δD que seguia a equação: $\delta\text{D} = 8 \delta^{18}\text{O} + 10$, para a qual foi dado o nome de “Reta Meteórica Global” [32].

Desses trabalhos exploratórios, publicados no fim da década de 1950 e início da década de 60, ficaram claras algumas tendências. Por exem-

plo, águas continentais eram sempre empobrecidas em ^{18}O em relação às águas oceânicas; a composição isotópica do oceano é relativamente constante; há uma correlação relativamente constante entre $\delta^{18}\text{O}$ e δD (Reta Meteorica Global) e a temperatura de condensação determina a intensidade do fracionamento isotópico entre a fase de vapor e líquida, como preconizado por Urey. Quanto maior a temperatura do ar, menor o fracionamento isotópico.

Em decorrência desse fato, a composição isotópica das águas meteóricas e de superfície são mais empobrecidas em ^{18}O e D (valores menores de $\delta^{18}\text{O}$ e δD) em latitudes maiores, principalmente no hemisfério norte, onde a temperatura é menor. Dansgaard [33], baseando-se nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e δD determinados por uma rede de coleta de chuva estabelecida em 1961 pela Agência Internacional de Energia Atômica e pela Organização Mundial de Meteorologia, derivou a primeira equação relacionando valores de $\delta^{18}\text{O}$ e temperatura do ar (T_a): $\delta^{18}\text{O} = 0.69T_a - 13.6\text{‰}$.

Supondo-se uma temperatura média do ar de 10 °C , o correspondente valor de $\delta^{18}\text{O}$ de acordo com a equação acima seria igual a -6.7‰ . Por outro lado, caso a temperatura média do ar fosse de 20 °C , o valor de $\delta^{18}\text{O}$ seria de 0.2‰ . Portanto, haveria uma tendência em função da latitude: quanto mais próximo do Equador, maiores seriam os valores de $\delta^{18}\text{O}$. A esse efeito foi dado o nome de “efeito da latitude”. Outro efeito da temperatura nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ seria em relação a altitude, pois a temperatura decresce a maiores altitudes, tornando os valores de $\delta^{18}\text{O}$ menores, conhecido como “efeito da altitude”.

Dansgaard também demonstrou o efeito da sazonalidade sobre os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação, em função da variação sazonal da temperatura, principalmente observado em áreas localizadas em maiores latitudes, onde há uma ampla variação sazonal da temperatura, conhecido como “efeito da sazonalidade”. O mesmo autor também observou que havia um empobrecimento em ^{18}O em função da quantidade precipitada. Assim, em eventos de longa duração havia decréscimo nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ em relação ao volume precipitado, ao qual ele atribuiu o nome de “efeito da quantidade” (ou “efeito do volume”). Finalmente, Dansgaard também demonstrou que, para águas de precipitação que sofreram significativa evaporação das gotas de chuva entre a nuvem e o solo, a inclinação da Reta Meteorica Global passava a ter um valor < 8 .

Com a ampliação da rede de coleta de precipitação pela Agência Internacional de Energia Atômica e utilizando-se técnicas de interpolação espacial, visando preencher locais onde não havia coleta de água, foi possível a construção das primeiras *isoscapes*, mostrando a variação espacial dos valores de $\delta^{18}\text{O}$. Posteriormente, os valores isotópicos da precipitação foram estimados a partir de coordenadas geográficas e elevação do terreno. Essas *isoscapes* encontram várias aplicações nas ciências forenses³.

A partir do conhecimento acumulado sobre a composição isotópica de águas meteóricas, continentais e oceânicas, Craig e Gordon deram um importante passo, demonstrando possíveis fracionamentos isotópicos que ocorreriam por moléculas de água transitando pelo sistema solo-planta-atmosfera, que, em sua forma simplificada, se torna:

$$\delta_L = (\epsilon + \epsilon_k) (1 - UR) + \delta_p$$

onde:

δ_L é a composição isotópica da água na folha;

δ_p é a composição isotópica da água de precipitação absorvida pela folha;

UR é a umidade relativa do ar;

ϵ é o fator de fracionamento de equilíbrio entre a fase líquida e vapor;

ϵ_k é o fator de fracionamento cinético [34].

Vale destacar, por fim, a grande contribuição que o então Laboratório de Hidrologia Isotópica do Cena (Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP), liderado pelos professores Eneas Salati e Eiichi Matsui, prestou ao desenvolvimento do uso de isótopos estáveis na água. Quase uma centena de artigos foram publicados, com destaque para o pioneiro deles, publicado por Salati *et al.* [35], demonstrando, através de isótopos da precipitação da região amazônica, a importância fundamental que as florestas da região têm na formação das chuvas.

4. O uso dos isótopos estáveis no Brasil

Não seria possível falar do processo histórico de uso de isótopos estáveis, assim como dos instáveis, sem citar o Centro de Energia Nu-

3 Ver Capítulo 4 – *Isoscapes*: ferramentas geoespaciais isotópicas para investigações forenses

clear na Agricultura, órgão de integração da Universidade de São Paulo fundado em 1966. Como mencionado, esse histórico de contribuições começou com o então Laboratório de Hidrologia Isotópica e continua até os dias de hoje com dois laboratórios: o de Isótopos Estáveis, mais voltado para a utilização de isótopos estáveis leves em estudos agrônômicos, e o Laboratório de Ecologia Isotópica, mais voltado para a utilização de isótopos estáveis em estudos ambientais.

O CENA formou também uma série de profissionais que em suas respectivas instituições iniciaram a aplicação de isótopos estáveis. Digno de nota é o laboratório fundado pelo saudoso professor Carlos Ducatti, na Unesp, campus de Botucatu, sendo até hoje uma das referências no país. Durante esses anos, várias parcerias foram firmadas, ampliando a utilização de isótopos estáveis. Vale lembrar a parceria estabelecida com a Universidade Federal Fluminense, onde Carlos Eduardo de Rezende era orientado pelo professor Luiz Drude de Lacerda. Após a sua formação, Rezende se estabeleceu na Universidade Estadual do Norte Fluminense, onde implementou um atuante laboratório de espectrometria de massas. O uso de isótopos estáveis em ciências forenses no Brasil foi impulsionado por Gabriela Bielefeld Nardoto, egressa do Laboratório de Ecologia Isotópica do Cena, que, por meio de uma parceria com o perito criminal Fábio José Viana Costa, do Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal, plantou a semente dos isótopos forenses em investigações criminais no âmbito da Polícia Federal.

No âmbito forense, cabe destacar iniciativas como o trabalho de Elisa Shibuya, relacionado à determinação de origem da maconha e pesquisas relacionadas à poluição ambiental lideradas pela Perita Criminal Cristina Barazetti Barbieri do IGP/RS (Instituto-Geral de Perícias), ambas sob a supervisão do Prof. Jorge Eduardo de Souza Sarkis, do Laboratório de Caracterização Química e Isotópica do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

Atualmente existem vários grupos no Brasil que utilizam isótopos estáveis em suas pesquisas. Em um levantamento preliminar, utilizou-se o Diretório de Grupos de Pesquisa do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) para esses grupos. Foram identificados cerca de 50 grupos que trabalham com essa técnica, empregando, principalmente, isótopos de carbono e nitrogênio. Quase a metade desses grupos (43%) se encontra na Região Sudeste, seguin-

do-se a Região Nordeste e Sul, com 20% dos grupos, e a Região Centro-Oeste, com 10% dos grupos. A área do conhecimento com maior concentração de grupos de pesquisa é a das Ciências Exatas e da Terra (57%), seguida pelas áreas das Ciências Biológicas (24%), Ciências Agrárias (16%) e Ciências da Saúde (3%).

Além da contribuição dada pelo grupo de Salati e Matsui, nos primórdios do uso da técnica isotópica no Brasil, os primeiros estudos utilizando a razão isotópica do carbono foram feitos por Matsui em colaboração com o Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, ligado naquela época à Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. O principal objetivo desse estudo foi estimar a contribuição relativa para o gado de gramíneas forrageiras do tipo fotossintético C_4 e leguminosas C_3 , que eram cultivadas em pastagens de forma consorciada.

A esse estudo de Matsui seguiram-se estudos sobre a contribuição dos extensos bancos de gramíneas nativas das várzeas da Amazônia para o sedimento depositado pelas enchentes sazonais, que foram tema de tese de Luiz Antonio Martinelli, então orientado por Reynaldo Victoria, por sua vez orientado por Eneas Salati. No ano seguinte, utilizando a razão isotópica do carbono para determinar a contribuição de plantas C_3 e C_4 para peixes do Rio Amazonas, foi publicado na revista *Science* o artigo “*Energy Sources for Detritivorous Fishes in the Amazon*”, em colaboração com os pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia Carlos Araújo-Lima e Bruce Forsberg [36].

Em 1985, a Universidade Federal de São Carlos sediou o primeiro “Simpósio sobre Ciclagem de Nutrientes em Ecossistemas Aquáticos e Terrestres”, possibilitando, portanto, a integração de pesquisadores de várias regiões, assim como de inúmeras áreas de conhecimento da ecologia e das ciências ambientais. A partir desse evento, no fim da década de 1980 e início da década de 90, foram estabelecidas várias parcerias e delas surgiram os primeiros estudos na interface continente-oceano utilizando-se isótopos estáveis. Mais precisamente foram realizados em um manguezal estudos integrando a composição isotópica do carbono do material particulado com a dinâmica de metais-traço.

Ficou então demonstrado o potencial de uso dos isótopos de carbono em estudos de transporte de poluentes metálicos ao se identificar claramente a mudança na contribuição do material de origem do manguezal e do ambiente marinho, o que fortaleceu o papel dos manguezais como

uma barreira biogeoquímica para estes poluentes. O uso dos isótopos de carbono demonstrou também o caráter diferenciado da matéria orgânica exportada pelos diferentes ciclos de marés, assim como informações sobre o balanço entre importação e exportação dependente da amplitude das marés. A partir desses estudos iniciais, o uso de isótopos estáveis foi se ampliando no país, estando hoje consolidado com um crescente número de grupos de pesquisa fazendo uso da técnica em diversas áreas do conhecimento.

Memórias do IRMS no Brasil – Por Ernesto Sens

Dos dados a seguir, nem todos estão documentados, sendo que alguns foram extraídos de nossa memória pessoal, com a máxima fidelidade. Algumas omissões podem ter ocorrido, pois não conseguimos dados suficientes – documentados ou de memória – para atestar a credibilidade.

Quando iniciei minhas atividades como engenheiro de serviços na Varian Medical Systems Brasil, em 1971, me deparei pela primeira vez com um Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica no Cena em Piracicaba. Fui incumbido de reparar algum defeito eletrônico (não lembro qual) em um IRMS modelo MAT CH4, já em uso há vários anos (não sei precisar quantos), mas certamente fora instalado na década de 1960. Foi uma surpresa enorme, pois tinha um aspecto assustador (ocupava uma sala grande inteira).

Na época eu desconhecia as técnicas analíticas e estranhei a funcionalidade do equipamento em si, todos os circuitos de controle, de fontes alimentação e de detecção utilizavam as ditas “válvulas eletrônicas”, pois não havia, à época de seu desenvolvimento, tecnologia disseminada de componentes semicondutores. O curso de eletrônica que eu acabara de concluir era de alto grau de atualização e sofisticação, utilizando FETs (Field Effect Transistors, os Transistores de Efeito de Campo), diodos, amplificadores, circuitos integrados etc. Conheci, então, na ocasião, o Prof. Dr. Eneas Salati (recentemente falecido) e o Prof. Dr. Eiichi Matsui, ambos operando e utilizando os dados do CH4 para suas pesquisas, a partir de determinações de razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em CO_2 , além de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Aí começou meu verdadeiro aprendizado em Espectrometria de Massas, graças à compreensão e dedicação dos professores citados em me introduzir e ensinar tudo para que eu fosse, um dia, útil nas minhas atribuições. Não posso deixar de mencionar um terceiro mentor de minha formação na área: Prof. Koji Kawashita, do Instituto de Geociências da USP.

No Cena havia também um espectrômetro IRMS modelo Varian MAT GD150 (também da década de 1960) especialmente desenhado para determinações da variação isotópica de H/D em amostras de água – utilizando urânio metálico para redução da água, obtendo-se precisão interna de 0,85‰, considerado muito relevante à época (em espectrômetros modernos a precisão interna para H/D é 0,08‰).

Já no início dos anos 1980, o Cena adquiriu um espectrômetro Finnigan MAT modelo Delta-E, para determinações isotópicas de H/D, N e C, usando o método de *dual inlet* de introdução de amostras e preparação de amostras externas. Foi na época do Prof. Reynaldo Victoria, que expandiu os laboratórios de isótopos estáveis do Cena e formou dezenas de pesquisadores na área. A Petrobras adquiriu seu primeiro IRMS (modelo Delta-E) na década de 1980 para análises geoquímicas de petróleo e derivados,

instalado no Departamento de Geoquímica Orgânica do Cenpes (Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello), encabeçado pelos químicos Francisco Concha e Tikae Takaki.

Anos depois foram adquiridas pelo Cena, pela Petrobras e por outras instituições versões mais modernas da família Delta (Delta V Advantage, Delta V Plus), já se utilizando a técnica de introdução por fluxo contínuo, além do *dual inlet*, para determinações isotópicas de C, N, O, S e HD. Ao que se pode resgatar, o primeiro espectrômetro de massas para Razão Isotópica de que se tem notícia no Brasil foi o chamado MS 1, praticamente *home made* na USP, Instituto de Geociências, à época encabeçado pelo Prof. Umberto Cordani, tendo o Prof. Koji Kawashita como seu braço direito.

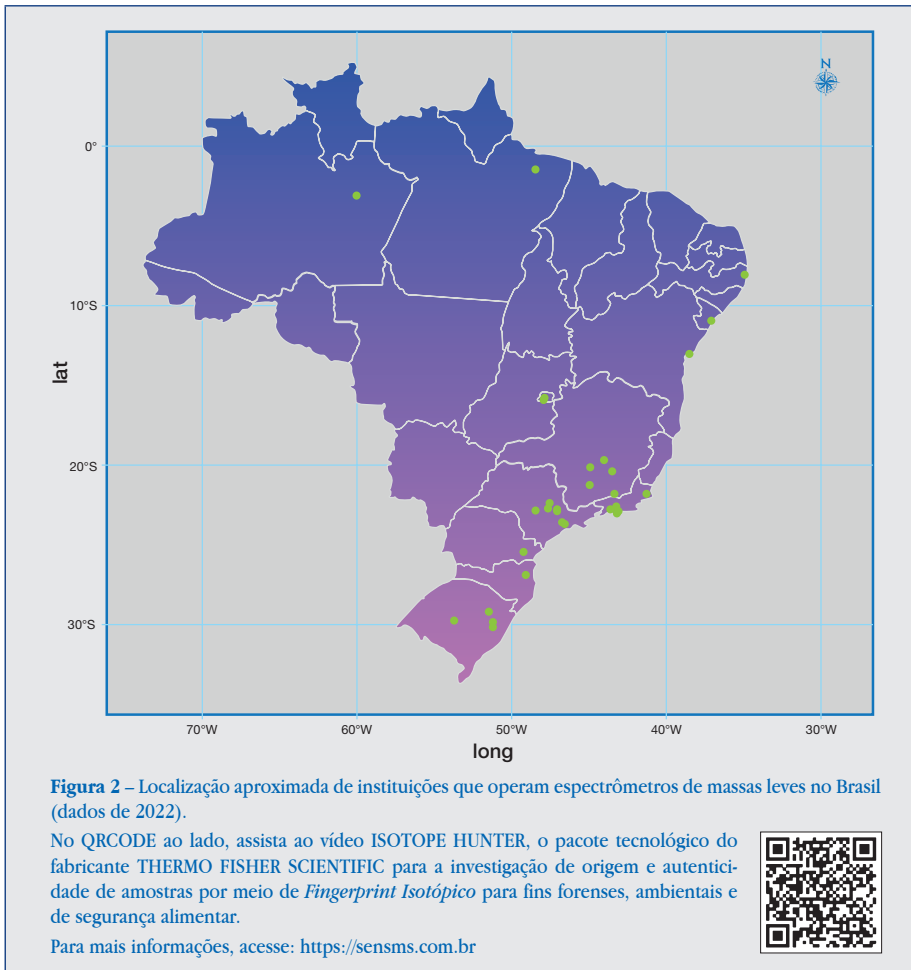
Tratava-se de um espectrômetro com os compartimentos sob vácuo acomodando fonte de íons e detectores, além do *flight tube*, sistema de introdução de amostras totalmente em vidro. A curiosidade é que a operação de introdução consistia em quebrar com uma peça de metal as cápsulas de vidro, sob vácuo, com um ímã manipulado externamente a fim de liberar as amostras e padrões para análise. Para se substituir um filamento da fonte de íons era necessário quebrar o compartimento de vidro e depois ressoldá-lo.

Infelizmente não tenho registro de dados obtidos com esse equipamento, mas tive a oportunidade de vê-lo funcionando. Ainda sobre o modelo GD 150, temos registros de outras instituições que o utilizaram: IME – Instituto Militar de Engenharia – e UFRJ, Instituto de Química, com o Prof. Cláudio Costa Neto a cargo do Polo de Xistoquímica. Ao fim dos anos 1970 foi lançado um modelo atualizado, Finnigan Delta S, desenhado para acoplamento a um Analisador Elementar por combustão, via fluxo contínuo, para análise isotópica de C e N. Também acomodava uma unidade de *dual inlet*. Uma única unidade de Delta S foi instalada no Brasil, na Unesp – Botucatu, sob a responsabilidade do Prof. Carlos Ducatti. Esse equipamento ainda se encontra operacional nos dias de hoje.

Foi na década de 1990 que se iniciou uma demanda crescente pela utilização do IRMS para as mais variadas áreas de aplicação, como: agricultura, hidrologia, indústria petroleira, controle de alimentos e bebidas, investigação forense, medicina, farmacologia, controle ambiental e oceanografia. Essa demanda e os avanços tecnológicos contínuos incentivaram os fabricantes de IRMS a desenvolverem equipamentos cada vez mais sensíveis, precisos, exatos, automatizados, rápidos e confiáveis.

A Finnigan MAT, depois adquirida pela Thermo Instruments, hoje Thermo Fisher Scientific, sempre liderou – e ainda lidera – esse segmento de mercado, oferecendo novos equipamentos e atualizações dos existentes, e pleno suporte aos usuários, a partir de sua fábrica em Bremen, na Alemanha, e de seus parceiros em todo o mundo.

No Brasil, a SENS comercializa e presta suporte técnico de alto nível, sendo exclusivamente dedicada à Espectrometria de Massas há 35 anos ininterruptos. Hoje há cerca de uma centena de espectrômetros de massas fornecidos através da SENS instalados e em operação no Brasil (Figura 2).



5. Referências bibliográficas

1. UREY, H. C.; BRICKWEDDE, F. G.; MURPHY, G. M. A hydrogen isotope of mass 2. *Phys Rev.* 1932;39:164.
2. UREY, H. C. Oxygen isotopes in nature and in the laboratory. *Science.* 1948;108:489-496. doi:10.1126/science.108.2810.489.
3. NIER, A. O.; GULBRANSEN, E. A. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *J Am Chem Soc.* 1939;61:697-698.
4. MCKINNEY, C. R.; McCREA, J. M.; EPSTEIN, S.; ALLEN, H. A.; TEU, H. C. Improvements in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotope abundance ratios. *Ver Sci Instrum.* 1950;21:724-730. doi:10.1063/1.1745698.