

Princípios básicos sobre as variações naturais dos isótopos estáveis

Martinelli, Luiz Antônio¹; Nardoto, Gabriela Bielefeld^{2*}; Costa, Fábio José Viana³; Mascarenhas, Ricardo de Oliveira⁴; Mayrink, Rodrigo Ribeiro⁵

¹Universidade de São Paulo – Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP)

²Universidade de Brasília – Departamento de Ecologia/Environmental Isotope Studies (EIS/UnB)

*autora correspondente – gbnardoto@unb.br

³Polícia Federal – Instituto Nacional de Criminalística – Laboratório Nacional de Isótopos Forenses (LANIF/PF)

⁴Polícia Federal – Setor Técnico-Científico no Estado do Paraná – Laboratório Nacional de Isótopos Forenses (LANIF/PF)

⁵Polícia Federal – Setor Técnico-Científico no Estado de Minas Gerais – Laboratório Nacional de Isótopos Forenses (LANIF/PF)

Em outubro de 2000, um esqueleto humano foi encontrado próximo à rodovia, num deserto aos arredores da cidade de Salt Lake City, Utah, EUA. Devido à quantidade de cabelos que estavam junto ao corpo, ele foi apelidado com o nome: “Saltair Sally”. O esqueleto feminino, com 26 ossos, alguns dentes, uma camiseta e um colar, foi recolhido pela polícia local. Devido à falta de elementos para dar continuidade à investigação, ela permaneceu engavetada por 12 anos. Apesar da aparente residência de Saltair Sally ser Salt Lake City, ninguém havia apresentado queixa de seu desaparecimento na região, e, por isso, ela permaneceu não identificada por tantos anos.

Em 2001, uma série de cartas suspeitas foi enviada a escritórios de veículos de comunicação e a três senadores dos EUA. As cartas continham esporos do micro-organismo *Bacillus anthracis*, responsável por infecções por antraz e causaram a morte de cinco pessoas e a internação de outras 17 à época. O ataque ficou conhecido como o caso “Amerithrax” e investigado pelo FBI. O Instituto de Pesquisa Médica em Doenças Infecciosas do Exército dos Estados Unidos (USAMRIID), em Fort Detrick, Maryland, analisou as cartas e chegou à conclusão de que as cepas bacterianas seriam do

tipo Ames. Essa cepa poderia ser encontrada em 15 instalações de pesquisa biológica dos EUA, incluindo o USAMRIID e o Dugway Proving Ground, de Salt Lake City, Utah, mas também em três laboratórios fora dos EUA. No entanto, ainda era necessário restringir as possibilidades de origem da cepa para se chegar aos autores do crime.

O que o corpo dessa desconhecida e dessas cartas terroristas podem ter em comum? Ambos os casos foram esclarecidos usando a mesma metodologia, a análise de isótopos estáveis. Novas pistas foram então adicionadas aos casos.

No caso Saltair Sally, duas outras regiões geográficas foram identificadas usando mapas que contêm gradientes de distribuição isotópica de oxigênio como possíveis locais onde Saltair Sally havia vivido ou visitado antes de sua morte. Foi então que a polícia enviou avisos para os departamentos de polícia dessas regiões e recebeu uma resposta positiva em agosto de 2012: Saltair Sally era, na verdade, Nikole Bakoles, uma jovem de 20 anos, natural do estado de Washington (distante mais de 1.000 km de Salt Lake City), cuja família aguardava há mais de uma década pelo desfecho de seu desaparecimento.

No caso Amerithrax, os peritos forenses usaram as composições isotópicas de hidrogênio e oxigênio dos esporos para fornecer informações sobre seu crescimento. Estudos em *B. subtilis* não patogênicos demonstraram que esses seus valores isotópicos refletiam a composição isotópica da água disponível no meio de crescimento. Como parte da investigação, foram coletadas amostras de água do USAMRIID de Fort Detrick, em Maryland, e do Dugway Proving Ground, em Utah. Com base nos mapas de distribuição isotópica relacionando os valores de hidrogênio e oxigênio da água e dos esporos, considerou-se “altamente improvável” que a água do Dugway Proving Ground tivesse sido usada no crescimento dos esporos enviados no caso. O caso Amerithrax está atualmente encerrado, após o suicídio de um dos principais suspeitos que havia trabalhado na USAMRIID, em Fort Detrick.

A determinação de origem geográfica, por meio dos mapas de distribuição isotópica, é uma das utilizações mais inovadoras da ferramenta isotópica para o rastreamento forense, tornando-se cada vez mais uma ferramenta investigativa dentro do sistema judiciário. São diversos os exemplos de sua aplicação na investigação da origem dos locais de produção de drogas ilícitas, tinta usada em documentos sigilosos, caça e comércio ilegal de animais e madeira, dinheiro falso, fraude e adulteração de alimentos, e até em análises de cenas de crimes.

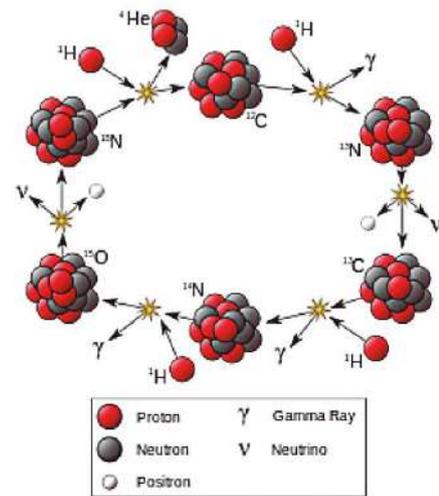
QUAL A ORIGEM DESSAS VARIAÇÕES ISOTÓPICAS?

No começo do universo havia apenas um átomo - o hidrogênio - constituído de um único próton e um único elétron e nenhum nêutron. Lentamente, átomos de hidrogênio foram se fundindo, originando o primeiro isótopo do universo, o deutério, que, como sendo uma variante do hidrogênio, tem também um próton e um elétron, mas como produto da fusão, passou a ter também um nêutron no seu núcleo atômico.

Isótopos são variantes de um elemento químico que tem no núcleo atômico o mesmo número de prótons, mas diferente número de nêutrons, lembrando que o número de prótons é a “impressão digital” de um elemento químico. Por exemplo, todo elemento químico com seis prótons será denominado carbono.

Na sequência de fusões atômicas nos primórdios do nosso universo, dois átomos de deutério fundiram-se formando um

segundo elemento, chamado hélio, que tem dois prótons e dois nêutrons em seu núcleo atômico. A fusão de mais átomos de hidrogênio ou hélio e a fusão de átomos de hélio e hidrogênio formaram uma série de elementos chamados “leves”, dentre eles, três elementos essenciais à vida: carbono, nitrogênio e oxigênio (Quadro abaixo).



Reações de fusão do chamado ciclo carbono-nitrogênio-oxigênio (ciclo CNO).

Nota-se no quadro acima que isótopos do carbono (^{12}C e ^{13}C) e nitrogênio (^{13}N , ^{14}N , ^{15}N) são formados nessa sequência de reações. Existem também alguns ciclos complementares de fusões nucleares que formam isótopos do oxigênio (^{16}O , ^{17}O e ^{18}O). A abundância de isótopos de um mesmo elemento na natureza é bastante distinta. No caso do oxigênio, o isótopo mais abundante é o ^{16}O , com cerca de 99,76%, seguindo-se o ^{18}O com apenas 0,2% de abundância, sendo o menos abundante de todos, o ^{17}O , com 0,04%. Esses são os chamados isótopos estáveis, em contraposição aos isótopos radioativos, que são aqueles que decaem com o tempo, transformando-se em um outro elemento, como o trítio (^3H) e o carbono-14 (^{14}C), ambos utilizados em datações de diversos materiais. Mas isso é uma outra história.

As abundâncias isotópicas são apenas abundâncias médias com o único propósito de mostrar que, para carbono, nitrogênio, oxigênio e deutério, a abundância do isótopo mais leve (^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^1H) é muito maior que sua variante com um maior número de nêutrons, os isótopos pesados (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , D).

COMO SE DESENVOLVEU A CIÊNCIA QUE PERMITIU AS ANÁLISES ISOTÓPICAS?

Há 100 anos, os trabalhos de Thompson, seguidos por Arthur Dempster e Francis Aston, desenvolveram a técnica denominada espectroscopia de massas, o que possibilitou a descoberta de mais de 200 isótopos naturais. Em 1939, Nier e Gulbransen, publicaram as primeiras determinações da abundância relativa entre ^{12}C e ^{13}C em diversos materiais. Esses autores também notaram que havia uma clara distinção entre rochas (ígneas e calcáreas) e material de origem biológica (carvão orgânico, madeira e as partes moles de um molusco); as primeiras favoreciam o acúmulo de átomos de ^{13}C , enquanto as últimas favoreciam o acúmulo de átomos de ^{12}C . Sobre essa tendência os autores escreveram: “De maneira geral, o isótopo pesado (^{13}C) parece ser favorecido em calcários, e o isótopo leve (^{12}C) em plantas”.

Apesar de, na época, os autores desconhecem os mecanismos responsáveis por essa “discriminação ou fracionamento isotópico”, chegaram à seguinte conclusão visionária: “É possível afirmar que a razão entre os isótopos de carbono, aparentemente, sofre pequenas variações na natureza. Essas variações provavelmente sejam relacionadas ao modo de formação. Obviamente, mais dados são necessários para substanciar tais efeitos, que pode levar a um novo método que determine a origem de compostos de carbono na natureza”.

Cerca de uma década depois, Wickman determinou a razão isotópica $^{12}\text{C}:^{13}\text{C}$ em mais de cem amostras de plantas, confirmando os primeiros resultados do grupo de Nier, ou seja, plantas favoreciam átomos de ^{12}C em detrimento a ^{13}C .

Harold Urey, em 1948, inverteu essa forma de expressar a razão isotópica para $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$. Como essa razão tornou-se desconfortavelmente pequena, por exemplo, 0.0112 (1/89) para carbonatos e cerca de 0.01098 (1/91) para plantas, ele propôs expressar essa nova razão em relação a um padrão e multiplicar por 1000 a diferença entre a razão isotópica da amostra menos a razão isotópica do padrão. Em 1950, o mesmo grupo, passou a expressar essa diferença pela letra grega “ δ ”, definindo-se a seguinte equação: δ (‰) = $(R_{\text{amostra}} / R_{\text{padrão}} - 1) \times 1000$, onde, R_{amostra} e $R_{\text{padrão}}$ são as razões isotópicas entre o isótopo leve sobre o isótopo pesado. Por exemplo, considerando-se o elemento carbono, a razão isotópica seria representada por $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$, nitrogênio por $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$, oxigênio por $^{18}\text{O}:^{16}\text{O}$ e hidrogênio D:H.

Com isso, passou-se então à busca por padrões universais que permitissem uma calibração entre laboratórios. Nessa busca, acabaram prevalecendo os padrões utilizados pelo laboratório de Harold Urey, que foi peça fundamental

no desenvolvimento da espectrometria de massas. Epstein e colaboradores, em 1950, mencionaram pela primeira vez o uso de carbonato de cálcio de um fóssil marinho denominado Belemnintella americana, semelhante às lulas atuais, mas que continham uma carapaça de carbonato. Esses fósseis foram encontrados na formação geológica americana Pee Dee, situado no estado da Carolina do Sul, tornando-se esse padrão conhecido como PDB. A razão $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ desse padrão foi determinada como sendo igual a 0.01118, ou seja, 1.1118 átomos de ^{13}C para cada 100 átomos de ^{12}C . De acordo com a equação acima, caso a razão isotópica da amostra (R_{amostra}) seja menor que a razão isotópica do padrão ($R_{\text{padrão}}$), o quociente $R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}$ será < 1 , ora, um valor menor que a 1, subtraído da unidade, torna-se negativo. Como o PDB é um carbonato, que tem mais ^{13}C do que amostras biológicas, então os valores de $\delta^{13}\text{C}$ em amostras biológicas serão negativos. Portanto, o sinal negativo é uma simples questão aritmética, e não isotópica.

Com o aumento da demanda por esse padrão por vários laboratórios, o PDB acabou se esgotando. Atualmente, ainda que a literatura mantenha como padrão o PDB, o padrão utilizado, na prática, é um carbonato denominado NBS-19 (National Bureau of Standards dos Estados Unidos, número 19), que, por sua vez, foi recalibrado em relação ao PDB original pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), que passou a ser o organismo responsável pela distribuição desse novo padrão. Como a sede da AIEA é em Viena, Áustria, esse novo padrão passou a ser chamado de VPDB. No entanto, essa denominação vem sendo pouco utilizada na literatura.

Em 1952, Epstein e Mayeda determinaram que o valor de $\delta^{18}\text{O}$ em 23 amostras coletadas em vários oceanos entre as profundidades de 500 a 2000 m e calibradas contra o oxigênio do carbonato de cálcio do padrão PDB, resultou em um valor de -0.04‰, um valor muito próximo a 0‰. Quase uma década depois, Craig determinou a razão H:D nessas mesmas amostras, nascendo assim, o padrão conhecido por “standard mean ocean water” (SMOW). Posteriormente, a AIEA tomou para si a distribuição desse padrão, que passou a ser conhecido como VSMOW. Portanto, atualmente, todas as determinações das razões $^{18}\text{O}:^{16}\text{O}$ e D:H são calibradas em relação a esse padrão.

Finalmente, como a concentração de N_2 é de cerca de 78% na atmosfera e pelo fato de sua razão isotópica ($^{14}\text{N}:^{15}\text{N}$) pouco variar, sendo igual a 0.003676, o ar atmosférico acabou sendo adotado como padrão universal para o nitrogênio. Na natureza, são encontrados tanto valores negativos como positivos de $\delta^{15}\text{N}$.

No começo da década de 60, com uma base conceitual e uma nomenclatura comum, bem como padrões analíticos universais estabelecidos, estavam postos os pilares para o nascimento de uma nova técnica analítica, empregando-se isótopos estáveis como previsto por Nier e Gulbransen (1939). Essa metodologia, ainda que nos seus primórdios restrita a estudos geológicos e hidrológicos, expandiu-se posteriormente para diversas áreas com destaques para ecologia, arqueologia, medicina e, mais recentemente, para ciências forenses.

PRINCÍPIOS BÁSICOS PARA ENTENDER AS DIFERENÇAS NAS PROPORÇÕES ISOTÓPICAS

A proporção isotópica de um elemento varia de acordo com sua passagem de um compartimento global (atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera) a outro, através de uma mudança de estado, como nos processos de evaporação-condensação que governam o ciclo da água, ou através de uma reação de oxirredução no caso da fotossíntese, onde CO₂ é reduzido metabolicamente pelas plantas superiores a um composto orgânico. Caso a razão isótopo-pesado:isótopo-leve de um elemento não variasse durante essas mudanças de estado ou transformações químicas, não haveria a possibilidade do uso dos isótopos estáveis como traçadores dos caminhos seguidos pelos principais elementos que fazem parte dos organismos vivos. Portanto, as mudanças na razão isotópica desses elementos entre os compartimentos (como oceanos, água doce, solos, flora e fauna), regulados por processos biogeoquímicos, são os alicerces da metodologia isotópica. Sem essas mudanças não estaríamos escrevendo essa matéria!

Em 1935, Urey e Greif foram pioneiros a mostrar que, em condições de equilíbrio químico, havia um “fator de enriquecimento isotópico”, ou seja, a maior massa atômica do isótopo mais pesado levava a certa “discriminação” ou “fracionamento” contra esse isótopo, favorecendo o isótopo mais leve. Em 1989, Farquhar e colaboradores descreveram como poderíamos aproveitar o fato de existir essa discriminação ou fracionamento (aqui fracionamento e discriminação são usados como sinônimos) para revelar informações sobre os processos físico-químicos e metabólicos envolvidos nas transformações de um determinado elemento. Exemplos clássicos de fracionamento isotópico estão relacionados com o ciclo da água - evaporação e condensação - e com o ciclo biológico do carbono - fotossíntese.

Quando um corpo hídrico sofre evaporação, a água residual fica com uma proporção relativamente maior de ¹⁸O

em relação ao vapor d’água formado. Caso todo o volume de água desse corpo fosse evaporado, não haveria fracionamento, pois todos os átomos de ¹⁸O e ¹⁶O teriam sido transferidos para a fase de vapor exatamente na mesma proporção que se encontravam na fase líquida. No processo de condensação, que é a passagem de vapor para a fase líquida, como ocorre em nuvens na atmosfera, ocorreria o inverso, por ser mais “pesado”, átomos de ¹⁸O cairão preferencialmente na forma de chuva, deixando a nuvem com uma proporção maior de ¹⁶O em relação à chuva, que, por sua vez, ficaria com uma proporção relativamente maior de ¹⁸O.

Geólogos e geoquímicos têm se aproveitado do fato demonstrado por Nier e Wickman no começo das décadas de 40 e 50, onde valores de $\delta^{13}\text{C}$ do carbono fixado pelo processo fotossintético são mais negativos que o carbono de origem geológica (decomposição de carbonatos), para investigar os primórdios dos sinais de vida em nosso planeta. A Terra tornou-se um planeta habitável há cerca de 4,3 bilhões de anos. No entanto, encontrar resquícios de formas de vidas pretéritas não é tarefa fácil. As rochas mais antigas encontradas até agora no planeta datam de mais de 4 bilhões de anos. No entanto, é raro encontrar rochas tão antigas na superfície do planeta e o intemperismo sofrido por esse material ao longo de bilhões de anos modifica o material original de tal forma que torna qualquer interpretação um exercício extremamente complexo. Pelos mesmos motivos, fósseis ou vestígios de organismos são também raros de se encontrar nessas condições. Ainda assim, o fóssil mais antigo até agora registrado foi encontrado somente recentemente e data de 3,7 bilhões de anos.

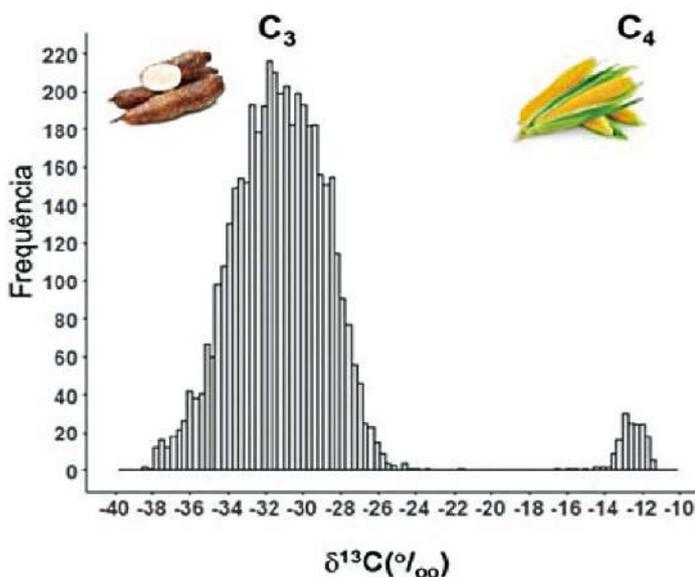
Levando-se essa complexidade em conta, Mojzsis e colaboradores determinaram que o valor de $\delta^{18}\text{O}$ do silicato de zircônio (ZrSiO_4) encontrado nessas rochas da região oeste da Austrália era de 5‰. Segundo eles, esse valor isotópico sugere que houve contato dessa rocha com água da superfície do planeta, que, naquele tempo, tinha valores isotópicos próximos a 5‰. Essa informação sobre o contato dessa rocha tão antiga com água meteórica abriu a possibilidade da existência de formas de vida primitivas, que, naquela época, eram exclusivamente aquáticas.

Em 2015, Elizabeth Bell e colaboradores, determinaram o $\delta^{13}\text{C}$ de inclusões de carbono em rochas mais antigas que 4 bilhões de anos coletadas na mesma região da Austrália em que Mojzsis e colaboradores trabalharam. A figura abaixo traz evidências de que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ dessas inclusões carbonáceas são muito próximos a valores encontrados em outras rochas e que são próximos aos valores

encontrados em plantas C_3 . Os autores concluíram que: “Devido ao fato de que essas inclusões se encontram incrustadas em rochas de no mínimo 4 bilhões de anos, é possível que o carbono empobrecido isotopicamente encontrado constitui-se prova que processos biológicos estariam ocorrendo durante o Hadeano”.

VARIAÇÕES ISOTÓPICAS DE CARBONO ENTRE OS TIPOS DE PLANTAS

As plantas que seguem o metabolismo fotossintético conhecido com C_3 , têm valores de $\delta^{13}C$ que variam de -38% a -22% , sendo o valor médio para plantas tropicais em torno de -32% . No entanto, existem dois outros tipos de fotossíntese: o metabolismo conhecido como C_4 e o metabolismo do ácido crassuláceo (CAM). As plantas denominadas C_4 , como são chamadas as plantas que seguem esse metabolismo, têm valores de $\delta^{13}C$ variando de -14% a -10% , enquanto as plantas CAM têm valores de $\delta^{13}C$ intermediários entre as plantas C_3 e as plantas C_4 . Essa diferença ocorre porque cada um desses metabolismos envolve enzimas diferentes e vias bioquímicas distintas, que, por sua vez, causam diferenças na grandeza do fracionamento isotópico entre o CO_2 atmosférico e as plantas C_3 , C_4 e CAM. Como exemplo, a figura abaixo mostra na forma de uma distribuição de frequência uma compilação de valores de $\delta^{13}C$ de folhas de plantas dos principais tipos de vegetação brasileira.



Valores de $\delta^{13}C$ de folhas de árvores dos principais tipos de vegetações dos biomas brasileiros. Notar a grande diferença entre os valores de $\delta^{13}C$ das plantas C_3 (à esquerda) das plantas C_4 (à direita).

MAS, AFINAL, QUEM SÃO AS PLANTAS C_3 , C_4 E CAM?

A maioria das plantas segue o ciclo fotossintético C_3 , algas também, alguns exemplos comuns e ligados à nossa alimentação seriam: arroz, feijão, mandioca, todos legumes e verduras e todas as frutas, quer dizer, quase todas. O abacaxi é uma planta que segue o metabolismo CAM, assim como o agave, matéria-prima para a fabricação da tequila, a bebida nacional do México. As orquídeas que ornamentam nossos jardins também são plantas que seguem o ciclo CAM.

As plantas C_4 , apesar de em menor número de espécies, têm uma grande importância na nossa alimentação, pois fazem parte delas: o milho, a cana-de-açúcar e todas as gramíneas forrageiras que utilizamos como alimento para o gado em nosso país. A grande maioria das plantas C_4 em ambientes tropicais são herbáceas. Há somente uma espécie lenhosa (*Euphorbia olowaluana*) natural do Hawaii. Portanto, com exceção dessa espécie, todas as outras espécies de árvores do mundo seguem o metabolismo C_3 .

Essa diferença de $\delta^{13}C$ entre as plantas C_3 e C_4 tem sido utilizada em uma gama de estudos para investigar a presença ou a proporção desses dois tipos de plantas em uma infinidade de tipos de amostras. Por exemplo, são clássicos os estudos sobre a dinâmica da matéria orgânica do solo empregando a metodologia isotópica. O trabalho pioneiro de Carlos Clemente Cerri mostrou que era possível utilizar valores de $\delta^{13}C$ da matéria orgânica do solo como indicador das mudanças na cobertura do solo, quando, por exemplo, uma floresta era substituída por um canal ou uma pastagem, lembrando que tanto cana-de-açúcar como gramíneas forrageiras tropicais seguem o metabolismo fotossintético C_4 . Esses estudos foram possíveis porque Cerri e colaboradores demonstraram que o fracionamento isotópico entre folhas mortas, principal fonte de carbono para o solo, e a matéria orgânica humificada é relativamente baixo. Assim, valores de $\delta^{13}C$ da matéria orgânica do solo refletem a composição da vegetação da qual se encontram em equilíbrio.

COMO ESSAS DIFERENÇAS ENTRE AS PLANTAS C_3 E C_4 PODEM SER USADAS PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PLANTAS C_4 EM ALIMENTOS OU BEBIDAS?

Onde menos se esperaria que houvesse tais plantas, os valores de $\delta^{13}C$ de determinados produtos confirmaram a presença inesperada das plantas C_4 . Exemplos clássicos foram aqueles que detectaram a presença de plantas C_4 em vinhos, cervejas e molho de soja (shoyu), além de uma gama variada de alimentos processados à venda em nosso país.

Em princípio, vinho é feito de uva, cerveja de cevada maltada, lúpulo e água e molho de soja, ora, de soja. Uva, cevada, lúpulo e soja são plantas que seguem o ciclo fotossintético C_3 . Portanto, caso esses produtos sejam produzidos somente a partir dessas plantas, os valores de $\delta^{13}C$ deles deveriam ser próximos aos valores desse tipo de plantas. Mas a realidade em nosso país é outra: o $\delta^{13}C$ médio de mais de cem amostras de vários tipos de vinhos produzidos no Brasil foi de aproximadamente -23% (tinto seco) e -22% (vinhos branco seco); enquanto que vinhos vinificados sem adição nenhuma de outro produto (somente mosto de uva), tiveram um $\delta^{13}C$ médio em torno de -26% (Martinelli et al. 2020). Esse contraste entre vinhos indica claramente que o açúcar de cana faz parte do processo de vinificação de alguns vinhos brasileiros.

O mesmo ocorre com a cerveja feita no país, para a qual o $\delta^{13}C$ médio de centenas de amostras foi igual a -19% . No entanto, nesse caso, a adição não é de açúcar de cana, mas sim de milho, que entra como um adjunto juntamente com cevada no processo de fermentação.

Talvez o exemplo mais inusitado seja a matéria prima utilizada na elaboração de molhos de soja (shoyu) produzidos no país. Tradicionalmente, shoyu é produzido no Japão a partir da fermentação da soja e do trigo, enquanto outros países asiáticos utilizam somente soja no processo. Dentre mais de 60 amostras de shoyu fabricadas no Brasil, valores de $\delta^{13}C$ indicaram que vários desses molhos utilizaram somente milho (Morais et al. 2018). Como pode o rótulo conter a clara denominação “molho de soja” e o produto ser feito exclusivamente a partir da fermentação do milho?

QUE INFORMAÇÕES PODEM SER OBTIDAS COM OS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE NITROGÊNIO?

As fontes de nitrogênio (N) para as plantas são várias. Caso sejam plantas que se associem a bactérias do gênero *Rhizobium*, como algumas espécies que pertencem às famílias das Fabaceae, N_2 atmosférico se torna uma fonte importante de N para as plantas. Como vimos, o ar atmosférico é utilizado como padrão para isótopos de nitrogênio, portanto, o $\delta^{15}N$ do N_2 atmosférico é, por definição, igual a 0% . O fracionamento isotópico entre o ar atmosférico e aquele fornecido à planta na forma de amônio (NH_4^+) é relativamente baixo; assim sendo, essas plantas que têm essa associação simbiótica com bactérias tendem a ter valores de $\delta^{15}N$ próximos a 0% . Por outro lado, a maioria das plantas não tem essa capacidade, e mesmo plantas que têm essa capacidade não dependem exclusivamente dessas fontes, pois o gasto energético é muito grande, ou seja, custa caro para a planta alimentar o *Rhizobium*; assim, a maioria das plantas depende muito mais de fontes de N do solo do que diretamente da atmosfera.

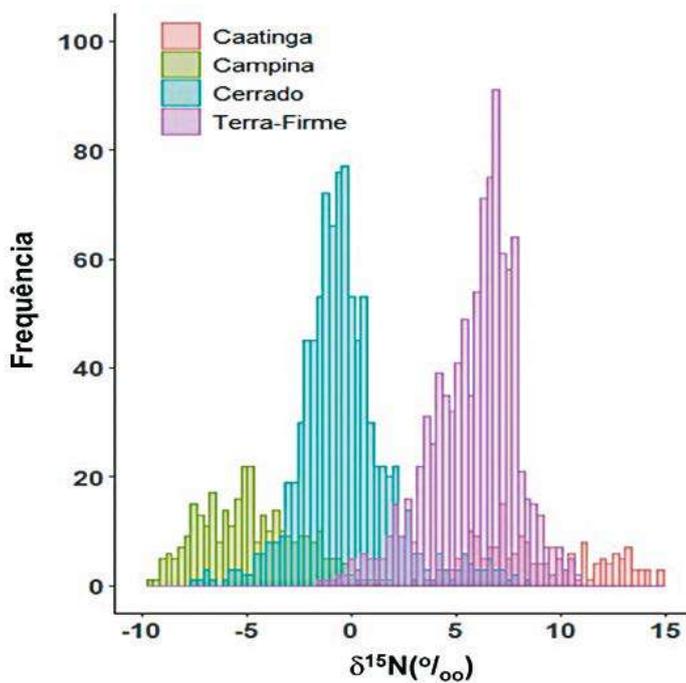
No solo, as plantas se utilizam basicamente de duas formas inorgânicas de N, o NH_4^+ e o nitrato (NO_3^-), ainda que algumas plantas sejam capazes de utilizar pequenas cadeias de aminoácidos livres do solo, elas são uma minoria.

Cada um dos processos associados à decomposição da matéria orgânica do solo causa diferentes fracionamentos isotópicos (Högberg 1997). Portanto, é extremamente complexo interpretar valores de $\delta^{15}N$ em plantas individuais de um determinado ecossistema, pois, além dessa variabilidade isotópica das possíveis fontes de N, algumas plantas mostram preferência por NH_4^+ ou NO_3^- (Robinson 2001). Por outro lado, considerando-se o valor médio de $\delta^{15}N$ de várias espécies de plantas de um ecossistema, algumas tendências surgem, tornando a utilização de isótopos estáveis de nitrogênio extremamente útil.

Há uma vasta literatura demonstrando que quanto maior a disponibilidade de N em um ecossistema, mais elevados serão os valores de $\delta^{15}N$ de plantas e solos desse sistema em decorrência das perdas gasosas que favorecem a perda de átomos de ^{14}N para a atmosfera (Houlton et al. 2006). Em ecossistemas onde a disponibilidade de N é baixa, além das reduzidas perdas gasosas, micorrizas que se associam

com as plantas, absorvem ^{14}N do solo e repassam às plantas (Craine et al. 2009), e com isso o sistema fica com $\delta^{15}\text{N}$ mais baixo.

Nesse sentido, o $\delta^{15}\text{N}$ da planta e no solo é um indicador da disponibilidade desse elemento no ecossistema. Por conta dessa tendência, existe uma diferença muito grande de valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre os principais tipos de vegetação do Brasil (Figura abaixo).

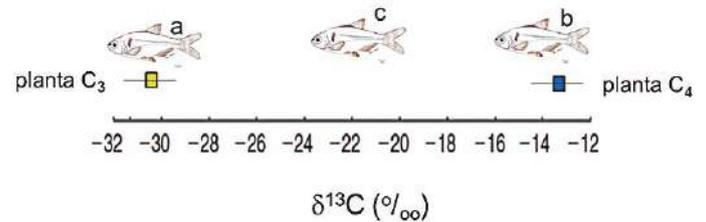


Distribuição de frequência de valores de $\delta^{15}\text{N}$ em folhas de árvores coletadas em três tipos diferentes de vegetação brasileira (dados não-publicados: Luiz A Martinelli).

MAS COMO ESSAS VARIAÇÕES NOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E NITROGÊNIO SÃO INCORPORADAS PELOS ANIMAIS?

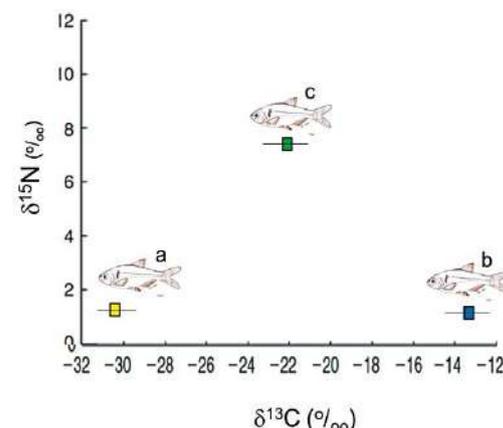
No caso do carbono, são milhares de estudos que investigam as potenciais fontes desse elemento na dieta de animais. Esses estudos baseiam-se na premissa de que o fracionamento isotópico entre plantas e tecidos animais, tais quais músculo, unha, pelo e sangue, é relativamente baixo (0 a 1‰). Portanto, valores de $\delta^{13}\text{C}$ desses tecidos são bons indicadores da proporção relativa de consumo de plantas C_3 e plantas C_4 (ver quadro a seguir). A metodologia isotópica veio, nessa linha de

estudo, complementar investigações sobre conteúdo estomacal, que representa aquilo que o animal ingeriu momentos antes da captura, mas que não será necessariamente assimilado; enquanto a análise isotópica reflete uma alimentação a mais longo prazo e que foi efetivamente digerida e assimilada.



Exemplo hipotético ilustrando o uso de isótopos estáveis do carbono em três diferentes indivíduos de uma mesma espécie de peixe. Segundo a investigação isotópica, o indivíduo "a" se alimenta presumivelmente de plantas C_3 , já o indivíduo "b" de provavelmente plantas C_4 e o indivíduo "c" pode se alimentar tanto de uma mistura desses dois tipos de plantas, ou de uma terceira fonte não identificada que presumivelmente teria valores de $\delta^{13}\text{C}$ em torno de -22‰.

No caso do nitrogênio, apesar da complexidade isotópica do N no sistema solo-planta, após um herbívoro incorporar N em seus tecidos pela ingestão de plantas, o fracionamento isotópico de N ao longo da cadeia trófica se torna praticamente constante. Animais perdem N principalmente pelas fezes e urinas. Fezes e urinas possuem proporções relativamente altas de ^{14}N , o que significa dizer que, por sua vez, os onívoros e carnívoros irão ter uma proporção relativamente maior de ^{15}N do que suas presas. Em outras palavras, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ vão aumentando em direção ao topo da cadeia, que aumenta em média 3‰ a cada nível trófico. Assim sendo, se uma planta tem um valor de $\delta^{15}\text{N}$ de 1‰, o valor de $\delta^{15}\text{N}$ do herbívoro consumidor dessa planta será 4‰, e o valor de $\delta^{15}\text{N}$ de um carnívoro intermediário que consumir esse herbívoro será 7‰ e, finalmente, o $\delta^{15}\text{N}$ do carnívoro no topo, consumidor do carnívoro intermediário, será 10‰.

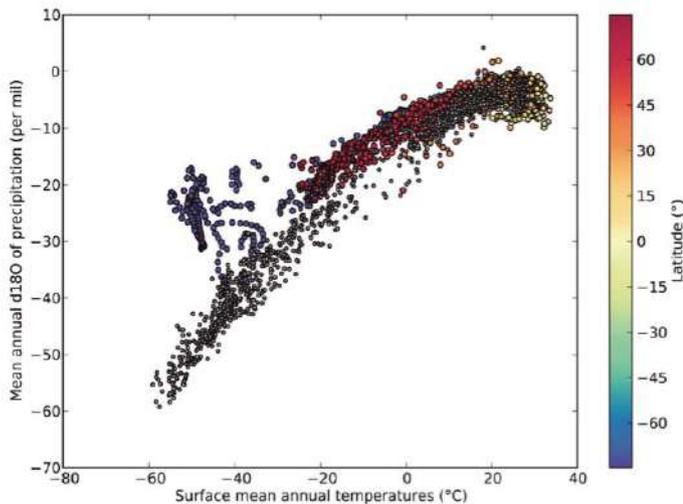


Relação hipotética entre $\delta^{13}\text{C}$ x $\delta^{15}\text{N}$ de três indivíduos de uma mesma espécie de peixe. Note que o peixe "c" estava se alimentando de uma terceira fonte não identificada e não de uma mistura de plantas C_3 e C_4 . Somente com o auxílio de um segundo isótopo foi possível identificar essa fonte extra de alimento, que provavelmente seja um inseto aquático.

E COMO OCORRE O FRACIONAMENTO DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DA MOLÉCULA DE ÁGUA QUE AJUDOU A SOLUCIONAR OS CASOS DE “SALT AIR SALLY” E “AMERITHRAX”?

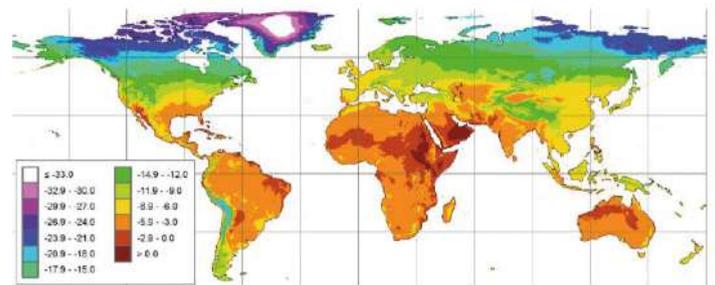
Isótopos de hidrogênio e oxigênio têm uma característica peculiar, que os diferencia do carbono e nitrogênio. O fracionamento isotópico entre o vapor d’água e a chuva que se formam pelo processo de condensação varia acentuadamente, conforme a temperatura da atmosfera. Devido a esse efeito, há uma boa correlação entre a temperatura e o $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação. Assim, através da temperatura média de um local pode-se inferir o valor médio de $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação do mesmo local.

A Figura abaixo, construída com dados da rede de coletas de precipitação para determinação dos isótopos estáveis do oxigênio e hidrogênio, coordenada pela AIEA (GNIP), correlaciona valores de $\delta^{18}\text{O}$ e temperatura.



Média anual da temperatura vs. média anual dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ na precipitação. Os pontos de cor cinza representam pontos da rede GNIP da IAEA enquanto os pontos coloridos representam dados de um modelo utilizado por Roche e Caley (2013) e as cores indicam a latitude em que as amostras foram coletadas.

Como a cobertura da rede GNIP não é extensiva a todas as partes do planeta, a reta derivada da correlação $\delta^{18}\text{O} \times \text{T}^\circ\text{C}$ pode ser utilizada para se obter um maior detalhamento da distribuição geográfica dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação sobre o globo terrestre ou sobre uma área menos extensa como um país. Começaram a ser feitas interpolações a partir destas correlações. Para que pudessem ser mais bem visualizadas a distribuição da variação isotópica, começaram a ser feitos mapas, que passaram a ser chamadas de isoscapes.



Valores de $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação derivado de interpolações obtidos através da correlação entre $\delta^{18}\text{O} \times \text{T}^\circ\text{C}$ (Terzer et al. 2013).

Essas isoscapes (do inglês: “Isoscapes” = “isotopic” + “landscapes”) de H, O assim como de C e N são amplamente utilizadas em nível global (West et al. 2014), e, mais recentemente, vêm sendo cada vez mais utilizadas em nível regional e até local. No contexto brasileiro, Sena-Souza e colaboradores (2019), apresentam o potencial de aplicação das isoscapes com os métodos já existentes e como preencher lacunas espaciais e metodológicas, mostrando como as isoscapes podem ser uma ferramenta fundamental em aplicações forenses. Essas isoscapes são a base para resolver casos como Saltair Sally e Ameritrax, que usam funções matemáticas para inferir a região de origem, a partir de valores isotópicos.

INCORPORANDO OS PRINCÍPIOS ISOTÓPICOS NAS CIÊNCIAS FORENSES DENTRO DO BRASIL

Isótopos estáveis já vêm sendo usados amplamente em casos forenses, e a maioria deles está relacionada ao rastreamento da origem geográfica ou adulteração de materiais. Com essa base científica consolidada torna possível a aplicação imediata

dessa metodologia em várias linhas das Ciências Forenses. No entanto, com o uso exponencial dessa metodologia em estudos forenses em todo o mundo, acabou se consolidando o termo “Stable Isotope Forensics”, que vem sendo cada vez mais usado tanto na área acadêmica como na área pericial.

Atualmente, no Brasil, estão sendo desenvolvidos estudos sobre como as razões isotópicas variam espacialmente nos tecidos vegetais e animais e de acordo com as condições ambientais regionais, na tentativa de produzir ou refinar isoscapes mais específicas e temporalmente compatíveis com casos forenses mais frequentes, relatados pelas forças periciais brasileiras. Dessa forma, a disponibilização de grandes bancos de dados se torna imperativa para as construções dessas isoscapes cada vez mais refinadas. Essas informações devem ser compartilhadas com os órgãos periciais, policiais e fiscalizadores, favorecendo a aplicação da ferramenta isotópica para controle de fraudes e investigações criminais.

QUANTAS “SALT AIR SALLY” EXISTEM NO BRASIL?

Assim como no caso Salt Air Sally, inúmeras investigações de pessoas desaparecidas ou assassinatos não resolvidos no Brasil poderiam ser elucidados com o auxílio da técnica isotópica. Segundo o último Anuário Brasileiro de Segurança Pública (2019), mais de 80 mil pessoas desaparecem anualmente no país, e sabe-se que milhares de ossadas não identificadas jazem nos institutos de medicina legal estaduais. Dentre esse imenso contingente, seguramente centenas ou milhares de casos poderiam ser solucionados com o emprego do rastreamento isotópico, assim como ocorreu com Salt Air Sally, nos EUA.

Para além dos crimes violentos e pessoas desaparecidas, a isotopia forense poderia contribuir também para a resolução de vasta gama de delitos, tais como tráfico de drogas, crimes ambientais, falsificação de moeda e documentos, fraudes alimentares e de medicamentos, contrabando e descaminho de mercadorias diversas, desvio e uso ilegal de explosivos, dentre outros. Com o fortalecimento da isotopia forense na rotina da perícia criminal, o país passa a ter, portanto, uma nova e poderosa ferramenta de aplicação da ciência em favor da Justiça.

REFERÊNCIAS

- BELL, E. A.; BOEHNKE, P.; HARRISON, T. M.; MAO, W. L. Potentially biogenic carbon preserved in a 4.1 billion-year-old zircon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, n. 47, p. 14518, 2015.
- CRAINE, J. M.; ELMORE, A. J.; AIDAR, M. P. M.; BUSTAMANTE, M. et al. Global patterns of foliar nitrogen isotopes and their relationships with climate, mycorrhizal fungi, foliar nutrient concentrations, and nitrogen availability. Oxford, UK. 183: 980-992 p. 2009.
- DANSGAARD, W.; CLAUSEN, H. B.; GUNDESTRUP, N.; HAMMER, C. U. et al. A new Greenland deep ice core. *Science*, 218, n. 4579, p. 1273-1277, 1982.
- HOULTON, B.; SIGMAN, D.; HEDIN, L. Isotopic evidence for large gaseous nitrogen losses from tropical rainforest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, n. 23, p. 8745, 2006.
- HÖGBERG, P. Tansley Review No. 95 15 N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist*, 137, n. 2, p. 179-203, 1997.
- MARTINELLI, L.; NARDOTO, G.; PEREZ, M.; FRACASSI, F. et al. Carbon and Nitrogen Isotope Ratios of Food and Beverage in Brazil. *Molecules*, 25, n. 6, p. 1457, 2020.
- MORAIS, M. C.; PELLEGRINETTI, T. A.; STURION, L. C.; SATTOLO, T. M. S. et al. Stable carbon isotopic composition indicates large presence of maize in Brazilian soy sauces (shoyu). *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, p. 18-21, 2018.
- NIER, A. O.; GULBRANSEN, E. A. Variations in the Relative Abundance of the Carbon Isotopes. *Journal of the American Chemical Society*, 61, n. 3, p. 697-698, 1939.

ROBINSON, D. $\delta^{15}\text{N}$ as an integrator of the nitrogen cycle. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, n. 3, p. 153-162, 2001.

ROCHE, D.; CALEY, T. $\delta^{18}\text{O}$ water isotope in the iLOVECLIM model (version 1.0): Part 2: Evaluation of model results against observed $\delta^{18}\text{O}$ in water samples. *Geoscientific Model Development*, 6, n. 5, p. 1493-1504, 2013.

SENA-SOUZA, J.; COSTA, F.; NARDOTO, G. Background and the use of isoscapes in the Brazilian context: essential tool for isotope data interpretation and natural resource management. *Revista Ambiente & Água*, 14, n. 2, p. 1-27, 2019.

TERZER, S.; WASSENAAR, L. I.; ARAGU, XE et al. Global isoscapes for $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ in precipitation: improved prediction using regionalized climatic regression models. *Hydrology and Earth System Sciences*, 17, n. 11, p. 4713, 2013.

THOMSON, J. J. (1912). "XIX. Further experiments on positive rays". *Philosophical Magazine. Series 6*. 24 (140): 209–253. doi:10.1080/14786440808637325.

THOMSON, J. J. (1910). "LXXXIII. Rays of positive electricity". *Philosophical Magazine. Series 6*. 20 (118): 752–767. doi:10.1080/14786441008636962.

COMO CITAR ESTE ARTIGO:

MARTINELLI, L. A. et al. Princípios básicos sobre as variações naturais dos isótopos estáveis. *Perícia Federal*, v. 1, n. 45, p. 49–58, 2020. <https://doi.org/10.29327/266815.1.45-1>