

MEDIDAS DA VARIAÇÃO NATURAL DA RELAÇÃO ISOTÓPICA
 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ EM AMOSTRAS ORGÂNICAS

CARLOS DUCATTI

Orientador: ENEAS SALATI

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Mes-
tre em Energia Nuclear na Agricultura

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro, 1977

*Aos meus pais, irmãos e à
Cleire,*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- A todos aqueles que de uma forma ou de outra permitiram a execução deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Eneas Salati, pela orientação, confiança e condições proporcionadas;
- Ao Físico Eiichi Matsui, pelos conselhos e conhecimentos a mim transmitidos;
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Admar Cervellini, pelas condições oferecidas;
- À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pela bolsa de estudo concedida;
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), na pessoa de seu diretor Dr. Warwick E. Kerr, pela colaboração proporcionada;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), proceso nº 77.00.69, pelo amparo financeiro;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo amparo financeiro;

- Aos meus amigos: Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, Rubismar Stolf e Lúcio Krol, pela amizade e colaboração;

- Aos colegas do Departamento de Biofísica do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola (FCMBB), pelo estímulo;

- À todo o pessoal técnico da Divisão de Ciências Ambientais do CENA.

INDICE

	página
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
3.1. Discriminação dos isótopos 12 e 13 do carbono, pelas plantas	07
3.2. O ciclo do dióxido de carbono em floresta	13
3.3. Método de preparo da amostra por combustão	19
3.4. Método de preparo do padrão por decomposição ácida..	26
4. METODOLOGIA	36
4.1. Fundamentos teóricos de análise da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ por espectrometria de massa	36
4.1.1. Desenvolvimento analítico, da equação isotópica, para a análise da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, do dióxido de carbono em relação ao padrão internacional PDB	39
4.1.2. Desenvolvimento analítico, da equação isotópica, para análise da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, do dióxido de carbono em relação ao "padrão de trabalho" CENA-std	47

	página
4.2. Material e Métodos	57
4.2.1. Material	57
4.2.1.1. Área de trabalho	57
4.2.1.2. Espécies vegetais	58
4.2.1.3. Balões de trabalho	59
4.2.1.4. Espectrômetro de massa	61
4.2.2. Métodos	61
4.2.2.1. Decomposição ácida do mármore "pa- drão de trabalho" CENA-std	61
4.2.2.1.1. Método de preparo do áci- do H_3PO_4 a 100%	61
4.2.2.1.2. Método de preparo do CO_2 "padrão de trabalho" CE- NA-std	63
a) Moagem	63
b) Balão de reação-vácuo.	63
c) Reação a $25^{\circ}C$	64
d) Extração a $-190^{\circ}C$	66
e) Transferência-ampolas.	68
f) Balão de expansão	70

g) Representação esquemática das etapas do método de preparo do CO ₂ "padrão de trabalho" CE-NA-std	70
4.2.2.2. Método de preparo do dióxido de carbono proveniente de cilindro	72
4.2.2.3. Combustão da matéria orgânica	72
4.2.2.3.1. Método de preparo de amostra	73
4.2.2.3.2. Sistema de combustão sob fluxo parcial de oxigênio	74
a) Purificação do oxigênio de cilindro, utilizado durante a combustão	74
b) Combustão a 900 ^o C da amostra	74
4.2.2.3.3. Sistema de combustão sob fluxo contínuo de oxigênio	76
a) Rotina de trabalho ...	77

4.2.2.4. Método de análise relativa da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ com um "padrão de trabalho"	80
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.1. Relativos à metodologia	85
5.1.1. Quanto à precisão e repetição do espectrôme- tro MAT-230	85
5.1.2. Quanto a precisão e repetição do método de preparo do "padrão de trabalho" CENA-std por decomposição ácida	85
5.1.3. Quanto à precisão e repetição do método de preparo da amostra por combustão	91
5.2. Relativos à amostragem	96
6. CONCLUSÕES	108
6.1. Relativas à metodologia	108
6.2. Relativas à amostragem	110
7. SUMMARY	112
8. LITERATURA CITADA	113

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1. Isótopos de carbono	03
Tabela 2. Variação da razão isotópica do carbono das plantas superiores, segundo os ciclos fotossintéticos	12
Tabela 3. Razão isotópica do carbono no CO ₂ respirado por plantas	17
Tabela 4. Comparação dos valores $\delta_{PDB}^{18O/16O}$ do CO ₂ obtido por decomposição ácida	31
Tabela 5. Valores isotópicos do "padrão de trabalho" CENA-std em relação ao padrão internacional PDB	33
Tabela 6. Ions positivos observados na análise isotópica do dióxido de carbono	38
Tabela 7. Espécies vegetais	58
Tabela 8. Rotina diária de análise relativa da razão ¹³ C/ ¹² C ou ¹⁸ O/ ¹⁶ O com "padrão de trabalho" CENA-std	80
Tabela 9. Análise relativa da razão ¹³ C/ ¹² C da amostra n° 147 com "padrão de trabalho" CENA-std	82
Tabela 10. Valores isotópicos do CO ₂ proveniente de cilindro comercial	86

Tabela 11. Valores isotópicos do CO_2 proveniente da decomposição ácida do "padrão de trabalho" CENA-std	88
Tabela 12. Diferença absoluta do "padrão secundário" TOILET-SEAT	90
Tabela 13. Precisão e repetição dos sistemas de combustão ..	92
Tabela 14. Precisão e repetição do sistema de combustão sob fluxo contínuo de oxigênio - "Linha Mook"(1968)..	94
Tabela 15. Diferença absoluta da amostra "carvão vegetal"...	95
Tabela 16. Dados da amostragem das folhas coletadas, de espécies vegetais da Reserva Florestal Ducke	98
Tabela 17. Valores isotópicos em $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ das folhas das espécies vegetais coletadas nas sub-áreas "Dentro" e "Fora" da Reserva Florestal Ducke	102
Tabela 18. Valores isotópicos em $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ das folhas "novas" e "velhas" das espécies vegetais coletadas a diferentes alturas das sub-áreas, "Dentro e "Fora" da Reserva Florestal Ducke.....	104

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Variação na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, de várias fontes naturais de carbono	08
Figura 2. O ciclo do carbono	14
Figura 3. Distribuição vertical da concentração do CO_2 (ppm) no ar, ao redor de uma floresta	16
Figura 4. Sistema de preparo do dióxido de carbono - <i>CRAIG (1953)</i>	20
Figura 5. Sistema de combustão do carbono - <i>MOOK (1968)</i>	23
Figura 6. Sistema de preparo do dióxido de carbono - <i>WIESBERG (1974)</i>	25
Figura 7. Sistema de preparo do CO_2 a partir da decomposição ácida de carbonato	28
Figura 8. Escala isotópica PDB	34
Figura 9. Diagrama geral, em blocos, do espectrômetro de massa	37
Figura 10. Espectro de massa do dióxido de carbono de 44 a 46	39
Figura 11. Área de trabalho: Reserva Florestal Ducke - Amazônia Central	57

Figura 12. Balões de trabalho	60
Figura 13. Sistema de vácuo	65
Figura 14. Sistema de extração do CO ₂ CENA-std para o balão metálico a -190 ^o C	67
Figura 15. Sistema de transferência do CO ₂ CENA-std para <u>am</u> polas a -190 ^o C	69
Figura 16. Representação esquemática das etapas do método de preparo do CO ₂ "padrão de trabalho" CENA-std.	71
Figura 17. Sistema modificado de combustão, sob fluxo parcial de oxigênio	75
Figura 18. Sistema modificado de combustão, sob fluxo <u>contí</u> nuo de oxigênio	78
Figura 19. $\delta_{PDB}^{13}C/^{12}C$ versus altura, das folhas de espécies vegetais coletadas na Reserva Florestal Ducke	105

1. RESUMO

O método de análise relativa da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ por espectrometria de massa, com um "padrão de trabalho", permite o estudo da variação natural de $1,0^{\circ}/\text{oo}$ em material orgânico, com erro analítico total, inferior a $0,2^{\circ}/\text{oo}$.

Desenvolveram-se equações para as determinações das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ relativas ao "padrão de trabalho" CENA-std e equações para padronização em relação ao padrão internacional PDB.

Comparou-se, quanto a valores isotópicos, duas linhas de combustão para a obtenção do dióxido de carbono da amostra, bem como o método de obtenção do dióxido de carbono "padrão de trabalho" CENA-std, a partir da decomposição ácida de material carbonatado, com métodos semelhantes utilizados em diversos laboratórios internacionais.

Como aplicação da técnica e dos métodos desenvolvidos, são analisadas folhas coletadas a diferentes alturas de diversas espécies vegetais, desenvolvidas "Dentro" e "Fora" da Reserva Florestal Ducke, da região Amazônica. Constata-se que, a variação natural na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$,

depende dos processos metabólicos e de fatores ambientais, permitindo qualificá-los como influências parciais no ciclo do dióxido de carbono em floresta.

2. INTRODUÇÃO

Os elementos mais importantes encontrados na natureza, que mostram uma variação isotópica natural, segundo *BOATO (1964)* são: Hidrogênio, Carbono, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre.

Dentre os isótopos de carbono conhecidos como podem ser vistos na Tabela 1, os de número de massa 12 e 13 são estáveis, sendo os demais radioativos.

Tabela 1 - Isótopos de Carbono

Isótopos	Abundância %	Massa Atômica	Tipo de Desintegração	Meia Vida
$^{10}\text{C}_6$			β^+	19,45s
$^{11}\text{C}_6$			β^+ , C.E.	20,3min
$^{12}\text{C}_6$	98,89	12,0000	estável	
$^{13}\text{C}_6$	1,11	13,00335	estável	
$^{14}\text{C}_6$			β^-	5730a
$^{15}\text{C}_6$			β^-	2,4s
$^{16}\text{C}_6$			β^- , n	0,74s

Fonte: *WEAST (1973)*

Pronunciadas variações naturais, segundo *RANKAMA (1956)*, ocorrem na composição isotópica do carbono e, a relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, é comumente usada para medir tais variações.

Face a ocorrência de variações isotópicas em ecossistemas naturais, resulta interesse em se procurar evidências de variações isotópicas do carbono por meio de medidas da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, as quais poderão fornecer indícios isotópicos preliminares, no estudo do ciclo do dióxido de carbono.

É frisado por *SALATI et alii (1976)*, que o grau de fracionamento induzido nos processos físico-químico simples, é bastante pequeno e geralmente, os processos naturais são notavelmente complexos. As eventuais diferenças na composição isotópica das substâncias naturais, são relativamente reduzidas, necessitando-se de uma metodologia de amostragem e análise de elevada precisão e sensibilidade, para detectar pequenas variações da relação isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ à nível natural.

À vista do exposto, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- a) Desenvolver um método de medida da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, do dióxido de carbono obtido pelo processo de combustão da matéria orgânica, por análise em espectrometria de massa, com alta precisão.
- b) Verificar se medidas das variações isotópicas naturais da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em folhas, coletadas a diferentes alturas de espécies vegetais desenvolvidas "dentro" e "fo

ra" da Reserva Florestal Ducke, permitem contribuir para o estudo do ciclo do dióxido de carbono, na floresta Amazônica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Discriminação dos isótopos 12 e 13 do Carbono, pelas plantas

A primeira determinação da relação isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, foi efetuada por *JENKINS e ORNSTEIN (1932)*, os quais encontraram um valor de 0,0094 para o carbono de origem terrestre, utilizando a espectrometria ótica, enquanto que, *VAUGHAN et alii (1934)* obtiveram um valor de 0,01092, resultado da primeira análise por espectrometria de massa.

NIER (1947), usando de um espectrômetro de massa especial, conseguiu a mais precisa determinação absoluta da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, analisando o dióxido de carbono obtido a partir de um carbonato de Solenhofem, encontrando o valor de $(1123 \pm 3) \times 10^{-5}$. *NIER (1950)* verificou evidências de variações naturais na composição isotópica do carbono.

WICKMAN et alii (1951), *WICKMAN (1952)* e *CRAIG (1953)* foram os primeiros a fornecer descrição da variação isotópica do carbono na natureza, e desde então grande quantidade de informações tem sido coletadas por *RANKAMA (1956)* e *RANKAMA (1968)* e outros.

Observa-se, conseqüentemente, que a espectrometria de massa tem sido amplamente utilizada por diversos pesquisadores, na determinação da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, como medida relativa da variação natural do carbono.

O presente conhecimento da variação na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, das várias fontes naturais de carbono, como citaram *PARK e EPSTEIN (1961)* Figura 1 - mostra os vários estágios do ciclo do carbono acompanhado por um fracionamento isotópico.

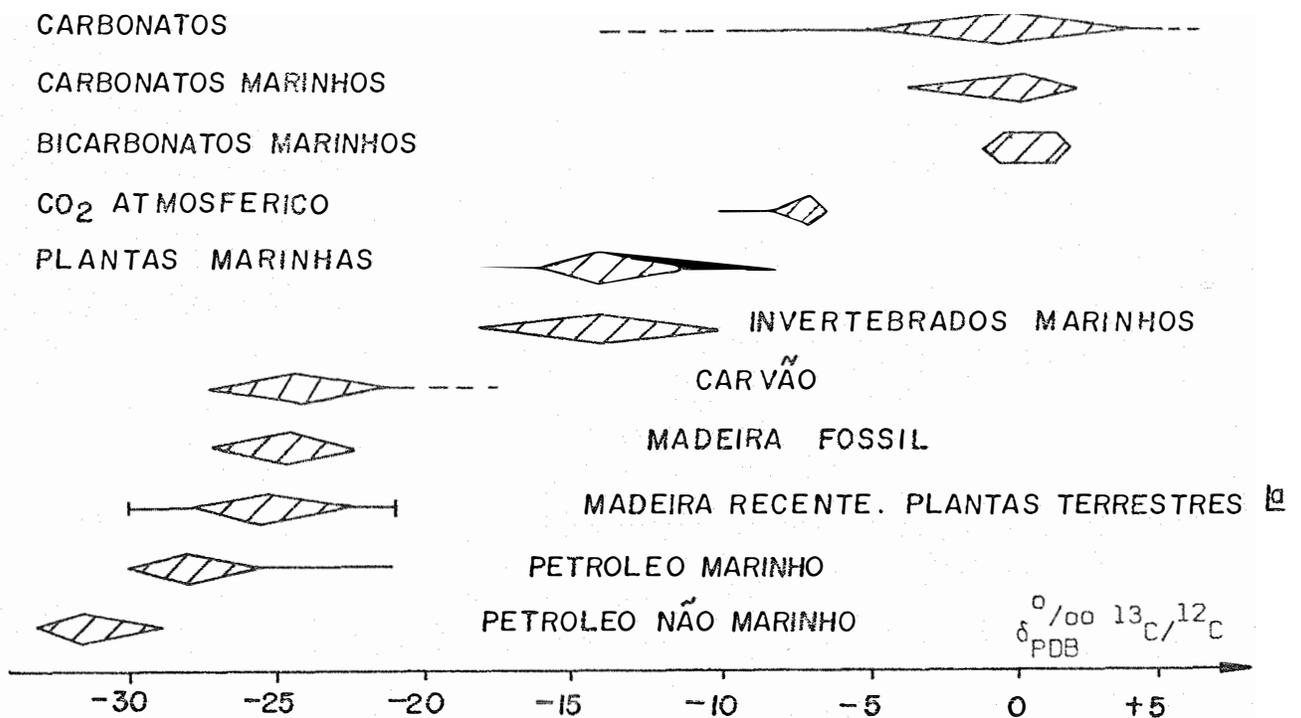


Figura 1 - Variação na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, de várias fontes naturais do carbono.

Fonte: *WIESBERG (1974)*

(a) *PARK e EPSTEIN (1961)*

Os trabalhos iniciais de NIER e GULHRANSEN (1939), UREY (1947), WICKMAN (1952), CRAIG (1953), CRAIG (1954a), CRAIG (1954b) CRAIG e BOATO (1955), PARK e EPSTEIN (1960), PARK e EPSTEIN (1961) e KEELING (1961b), relataram a ocorrência da variabilidade nas concentrações de ^{12}C e ^{13}C em material orgânico, sendo que, estas variações isotópicas estão diretamente relacionadas com os mecanismos de fixação fotossintética do carbono pelas plantas.

Destes trabalhos, alguns autores, sugeriram hipóteses caracterizando a variação na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ nas plantas, visto que o CO_2 atmosférico apresenta, em média, um valor em $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (1) de -7‰ , observado por CRAIG (1953), KEELING (1958) e KEELING (1961a), enquanto que, as plantas da biosfera terrestre apresentam em média um valor de $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de -25‰ , observado por CRAIG (1953) e PARK e EPSTEIN (1961).

Assim, WICKMAN em 1952, propôs que as diferenças ecológicas, especialmente as variações no suprimento do ar local, constituía na maior causa das variações da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, após observar que, as razões isotópicas em plantas de locais abertos, mostravam-se maior do que nas plantas que se desenvolviam em locais com circulação de ar "restrito".

O mesmo autor cita que o dióxido de carbono é assimilado pelas plantas do ar local, com taxa de reação levemente diferente para $^{12}\text{CO}_2$ e $^{13}\text{CO}_2$, e armazenado na planta, por algum tempo, retornando eventual

(1) A simbologia em $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ indica a diferença em per mil da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação a razão isotópica do padrão PDB, dividida pela razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do mesmo padrão, segundo equação (c) do item 3.4.

mente ao ar a partir do solo; parcialmente pela respiração da planta e parcialmente através do metabolismo de microrganismos, ocorrendo a todo o tempo, troca do CO_2 entre o ar local e a atmosfera. Ainda, segundo o mesmo autor, estas condições são equivalentes às usadas no processo cíclico de enriquecimento isotópico.

Entretanto, *CRAIG* em 1954b, não encontrou nenhuma evidência similar com relação à variação ambiental, e independente observou que partes distintas de uma mesma planta, apresentavam diferentes razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. O mesmo autor citou ainda que, a hipótese de *WICKMAN* (1952) não poderia ser satisfeita para uma comunidade de plantas, onde o dióxido de carbono, entrando e saindo livremente, mantivesse uma situação de equilíbrio ("steady-state"). Consequentemente, concluiu que não existia nenhum mecanismo cíclico que produzisse um enriquecimento isotópico nas plantas, maior do que aquele da própria planta, ou seja, dos próprios processos metabólicos.

Reforçando a idéia do fracionamento isotópico conduzido na própria planta, *PARK* e *EPSTEIN* em 1960, sugeriram um modelo metabólico de dois estágios, sendo que o primeiro fracionamento consistia de um efeito cinético durante a entrada do CO_2 atmosférico para o citoplasma da folha. O segundo, ocorria durante a fixação do CO_2 dissolvido no citoplasma, uma vez que, o CO_2 gasoso entrava em equilíbrio com o CO_2 dissolvido, e ions bicarbonatados, via reações bioquímicas.

KEELING em 1961b, admitia que ambas as idéias de fracionamento isotópico do carbono ocorriam, ou seja, a ambiental proposta por *WICKMAN* em 1952 e a metabólica sugerida por *CRAIG* em 1954b, e reforçada

por *PARK e EPSTEIN* em 1960. Segundo o mesmo autor, *KEELING (1961b)*, tais hipóteses favoreciam com maior ou menor intensidade o fracionamento isotópico do carbono efetuado nas plantas.

SMITH e EPSTEIN (1971) relataram que plantas de altos valores em $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (-6 a -19⁰/oo), diferem das plantas que apresentam baixo valor (-24 a -34⁰/oo), com respeito à anatomia, fisiologia, bioquímica e ecologia.

Entretanto, a capacidade de discriminação entre carbono-12 e carbono-13 efetuado pelas plantas, segundo *TROUGHTON et alii (1974a)*, varia entre as espécies e com o tipo de reação de fixação fotossintética. Pode-se observar pela Tabela 2, dos mesmos autores, que existem entre as plantas superiores, três mecanismos de fixação: o ciclo de *CALVIN* (ciclo "C-3"), ciclo de *HATCH-SLACK* (ciclo "C-4"), e o ciclo do metabolismo ácido Crassulaceo (ciclo "CAM"). Estes três sistemas bioquímicos, segundo *BUKOVAC et alii(1975)*, foram descobertos durante o estudo da redução do dióxido de carbono efetuada pelas plantas superiores. Dois destes, os simbolizados como "C-3" e "C-4", se o primeiro produto estável da fixação do CO₂ contiver respectivamente três ou quatro átomos de carbono, e o terceiro chamado de ciclo metabólico do ácido crassulaceo, assim designado, em virtude do primeiro estudo desta natureza ser efetuado com plantas da família Crassulacea.

Tabela 2 - Variação na razão isotópica do carbono das plantas superiores, segundo os ciclos fotossintéticos.

	$\delta_{\text{PDB}}^{13\text{C}/12\text{C}}$		
	"C ₃ "	"C ₄ "	"CAM"
Dicotiledôneas	-27,31 ± 2,80	-14,10 ± 1,74	-16,66 ± 5,35
Monocotiledôneas			
Não Gramíneas	-27,88 ± 3,34	-12,89 ± 0,80	-17,63 ± 4,45
Gramíneas	-28,11 ± 2,55	-13,46 ± 1,55	
Total	-27,76 ± 2,75	-13,56 ± 1,62	-17,63 ± 4,76

Fonte: *TROUGHTOM et alii (1974a)*

O local da discriminação dos isótopos de carbono, segundo *BERRY e TROUGHTOM (1974)*, e as razões para as diferenças entre as plantas com distintos mecanismos de fixação do dióxido de carbono, estão provavelmente associados com o transporte da reação de carboxilação.

SALATI et alii (1976), baseado no modelo metabólico de *PARK e EPSTEIN (1960)*, apresentaram a hipótese de que o fracionamento isotópico do carbono nas plantas, deve ser efetuado em três estágios de fracionamento distintos: um mecânico, atribuído ao processo de absorção do CO₂ atmosférico, através da parede celular; um enzimático, dependente do tipo de ciclo fotossintético utilizado e, um terceiro fracionamento, efetuado durante a translocação do dióxido de carbono no sistema vascular da planta. Os mesmos autores, concluíram que o valor específico na razão iso-

tópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ apresentado por uma determinada planta, pertencente a uma classe, será função; quer das condições fisiológicas da planta, ou das condições ecológicas, nas quais elas se desenvolveram ao longo do processo evolutivo ou passaram a se adaptar posteriormente.

3.2. O ciclo do dióxido de carbono em floresta

A Hiléia de Humboldt e Bonplawd, formada pelas densas matas da Bacia do Rio Amazonas e Alto Orenoco, segundo *TEIXEIRA(1967)*, constitui a mais extensa área de floresta tropical do mundo, ocupando 3.500 km². O mesmo autor afirma que, as estimativas fornecem um mínimo de 200000 espécies vegetais, distribuídas por numerosas regiões ecológicas, variando desde a mais luxuriante, até a mais pobre área, hostil a qualquer tipo de vegetação.

GOODLAND e IRWIN (1976) relataram, de um modo geral, sobre a fragilidade do acervo científico a respeito dos ecossistemas amazônicos, afirmando que, de todos os paradoxos da Amazônia, o mais espantoso é o manto de silêncio e ignorância que a envolve.

O comportamento de um ecociclo, sugerido por *TROUGHTON et alii (1974b)*, pode ser investigado com o uso de isótopos estáveis, os quais, através da discriminação isotópica, causada por processos físico-químicos, que conduzem a uma "singular impressão digital isotópica", permitem a identificação do processo envolvido.

De uma maneira geral, *BOLIM (1974)*, apresentou uma visão

ampla do ciclo do carbono em floresta -Figura 2- afirmando ser o ciclo principal, o do dióxido de carbono até a matéria viva, e desta de volta ao CO_2 .

O mesmo autor afirmou que: "o ciclo do carbono começa com a fixação do CO_2 atmosférico pelo processo de fotossíntese, realizado por plantas e certos microrganismos.

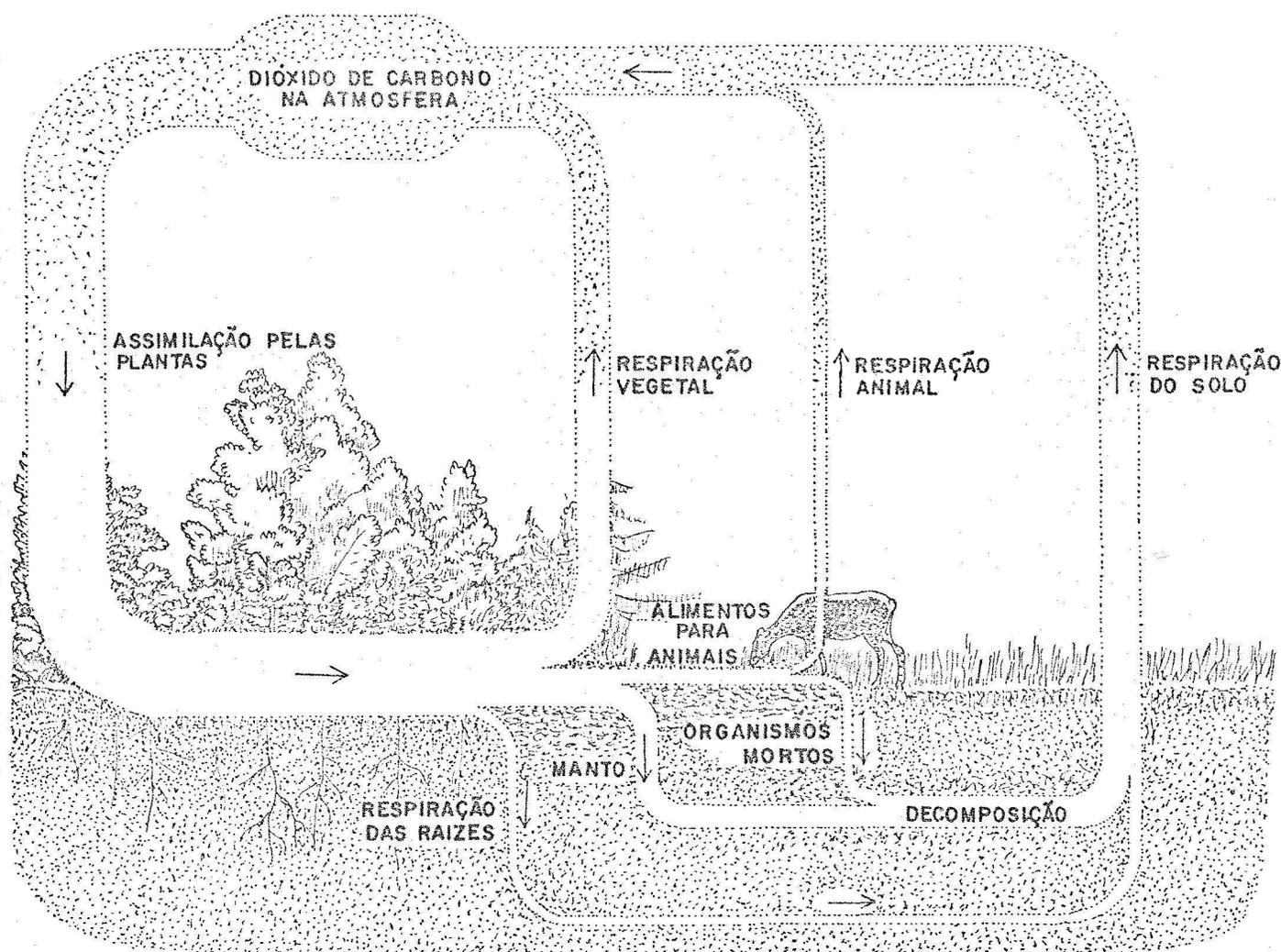


Figura 2 - O ciclo do carbono

Fonte: BOLIM (1974)

Neste processo, o dióxido de carbono e a água reagem para formar carboidratos, com a liberação simultânea de oxigênio para a atmosfera. Parte dos carboidratos é consumido diretamente para suprir energia à planta sendo o dióxido de carbono liberado, ou pelas folhas das plantas, ou por suas raízes. Parte do carbono fixado pelas plantas é consumido pelos animais, que também respiram e liberam dióxido de carbono. Vegetais e animais morrem e são posteriormente decompostos por microrganismos no solo, sendo o carbono de seus tecidos oxidado a dióxido de carbono e retornando a atmosfera".

Fatores inerentes ao desenvolvimento da planta com o meio em que vivem, segundo *CRAIG (1953)*, contribuem também para o fracionamento isotópico natural do carbono, onde plantas da mesma espécie de diferentes locais e diversas espécies de um mesmo local, mostraram diversidades na composição isotópica.

Uma possível causa na variação da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, em grupos de plantas, segundo *TROUGHTON et alii (1974a)* de -10 a -19‰, com valor médio de -14‰, e de -21 a -36‰ com valor médio de -28‰, é devido à variação na razão isotópica do CO_2 atmosférico "interno", e reforçada por *KEELING (1958)* que constatou a variação proporcional entre a concentração molar e a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do dióxido de carbono no ar da floresta.

KEELING (1961a) verificou que a concentração do CO_2 no ar, mostrava dependência com chuva, temperatura ou estação, refletindo conseqüentemente na razão isotópica do dióxido de carbono. O mesmo autor, mostrou a ocorrência da variação diurna nos valores δ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ CO_2 at-

mosférico, em regiões florestais, relacionando-a com a variação diurna antecipada na fotossíntese.

O dióxido de carbono na floresta, segundo *BOLIM (1974)*, sofre pronunciadas variações em sua concentração, (ppm) durante um período de 24 horas, como se observa na Figura 3.

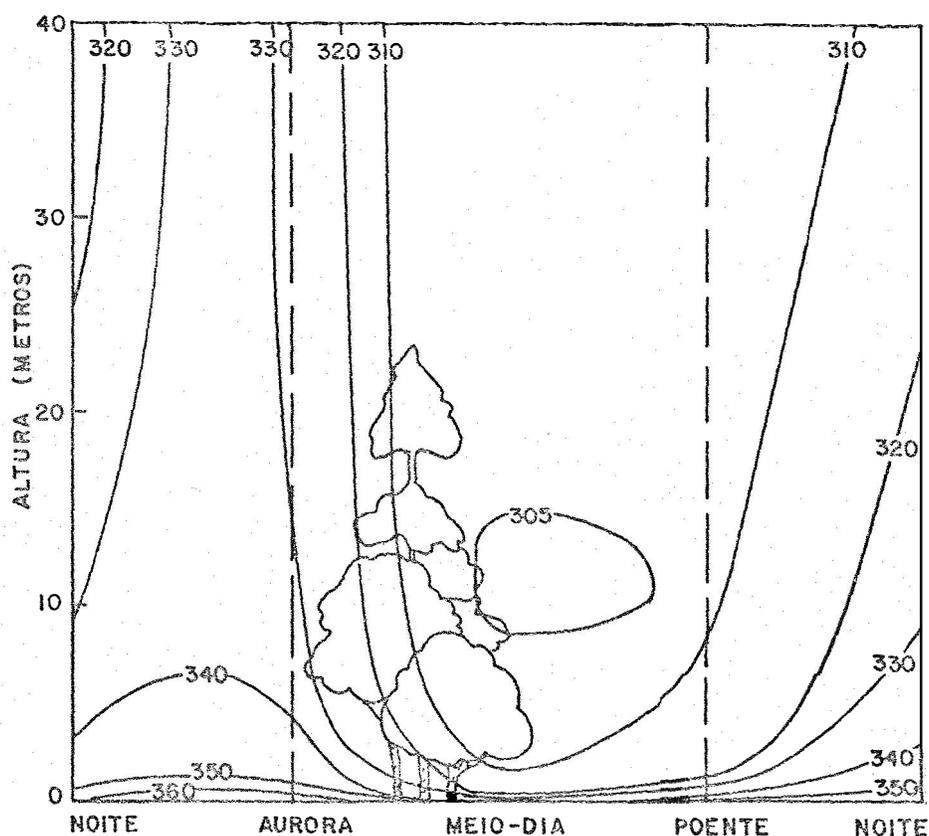


Figura 3 - Distribuição vertical da concentração do CO₂ (ppm) no ar, ao redor de uma floresta.

Fonte: *BOLIM (1974)*

O CO₂ produzido durante o dia, segundo *TROUGHTON et alii (1974a)*, pode influir nos valores $\delta_{PDB}^{13C/12C}$ do tecido das plantas, pelo fracionamento isotópico, durante a reação de descarboxilação ou pela

reassimilação durante a fotossíntese. Segundo os mesmos autores, o fracionamento durante a respiração é possível, mas os valores em $\delta_{\text{PDB}}^{13\text{C}/12\text{C}}$ do CO_2 respirado à noite geralmente fornecem valores correlatos com os valores da folha, para ambas as plantas " C_3 " e " C_4 ", como se observa pela Tabela 3.

Tabela 3 - Razão isotópica do carbono no CO_2 respirado por plantas

	$\delta_{\text{PDB}}^{13\text{C}/12\text{C}}$		
	Folhas	CO_2 noturno	CO_2 diurno
Tipo de planta " C_3 "			
Gossypium hirsutum	-31,3		-21,6
Triticum aestivum (Gabo) (incluindo espiga)	-30,4	-25,5	-17,9
Pinus radiata (incluindo talo)	-25,7	-29,4	
Tipo de planta " C_4 "			
Paspalum dilatatum	-14,7	-14,9	-17,3
Gomphrena globosa	-15,7	-17,5	
Zea mays	-13,9	-15,7	-20,0

Fonte: TROUGHTON *et alii* (1974a)

RANKAMA (1956), cita WICKMAN (1952), o qual concluiu que, o enriquecimento isotópico nas plantas estava intimamente ligado ao ciclo do carbono e que, a variação na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ era primariamente um problema ecológico, admitindo que o ciclo local do carbono consistia de um in-

tercâmbio entre o substrato, a planta e o ar local, com trocas adicionais entre o CO_2 da atmosfera local e o dióxido de carbono da atmosfera principal.

Entretanto, as plantas analisadas por *CRAIG (1953)* não indicaram nenhuma variação na composição isotópica quanto à espécie, datas de coleção, variação com a altitude, localização geográfica e nenhuma correlação destes efeitos com o carbono presente nas amostras de madeira. Embora o carbono da folha não difira marcadamente do carbono da madeira, as folhas de uma árvore individual são mais leves isotopicamente do que a madeira, por uma quantidade que varia de 0,5 a 2^o/oo. O mesmo autor conclui que, a pequena diferença na constituição isotópica do carbono nas folhas atribuiu-se à variação local na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do CO_2 atmosférico.

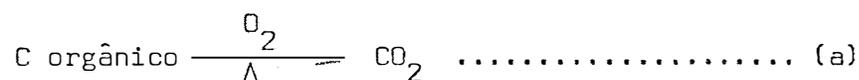
WIESBERG (1974), analisando fatias de tronco de carvalho, tomadas a intervalos de 2m, questionou o uso da madeira como um "registor isotópico", verificando que, a dependência da altura com a composição isotópica não fora significativa, encontrando um valor de 0,01^o/oo por metro.

Evidências diretas de um efeito isotópico associado com altura tomada a partir do solo, foram indicadas nas medidas realizadas por *MÜNICK e VOGEL (1959)*, os quais verificaram um decréscimo em ^{12}C do nível do chão a 20m de altura, de árvores em uma floresta da Bavaria Superior, onde a variação total na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ foi 4^o/oo.

3.3. Método de preparo da amostra por combustão

A determinação da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em compostos orgânicos, segundo *BARNARD (1953)*, requer primeiramente o preparo de um simples composto gasoso de carbono, sendo o composto mais satisfatório para esta determinação, o dióxido de carbono.

A obtenção do dióxido de carbono, a partir da matéria orgânica, segundo *STEYMARK (1961)*, baseia-se na conversão total do carbono orgânico a dióxido de carbono por combustão - equação (a) - na qual os compostos orgânicos de carbono, são queimados sob calor (Δ) em atmosfera de oxigênio.



NIER e GOLBRANSEN (1939) e *WICKMAN (1952)*, sem maiores detalhes, relataram que as amostras orgânicas foram queimadas em um forno de combustão, sob atmosfera de oxigênio.

CRAIG (1953), descreveu parcialmente um sistema a vácuo - Figura 4 - para a obtenção do dióxido de carbono, a partir, tanto de amostras orgânicas, como amostras carbonatadas. Durante o preparo do dióxido de carbono, a partir da matéria orgânica, o mesmo autor citou que o sistema de combustão propriamente dito, consistia do forno de combustão (A), "trap" (B), e uma bomba Toepler (C) operada eletricamente, servindo para a reciclagem dos gases através do óxido de cobre durante a combustão conduzida à temperatura de 900 a 950°C. O oxigênio usado sob uma pressão de 15cm de Hg, providenciado por um cilindro, era purificado, preliminar-

A: Forno de combustão, 900-950°C

B: "Trap" a -80°C

C: Bomba Toepler automática

D: Manômetro de mercúrio

E: Balão de reação

F: Balão de amostra

G: Medidor de vácuo

H: Forno a 700°C

I: "Trap" a -190°C

J: Linha de alto vácuo

K: Junta de vidro. Entrada da amostra orgânica a ser queimada

L: Coluna de mercúrio

M: "Trap" a -190°C

I & 18: Torneiras do sistema

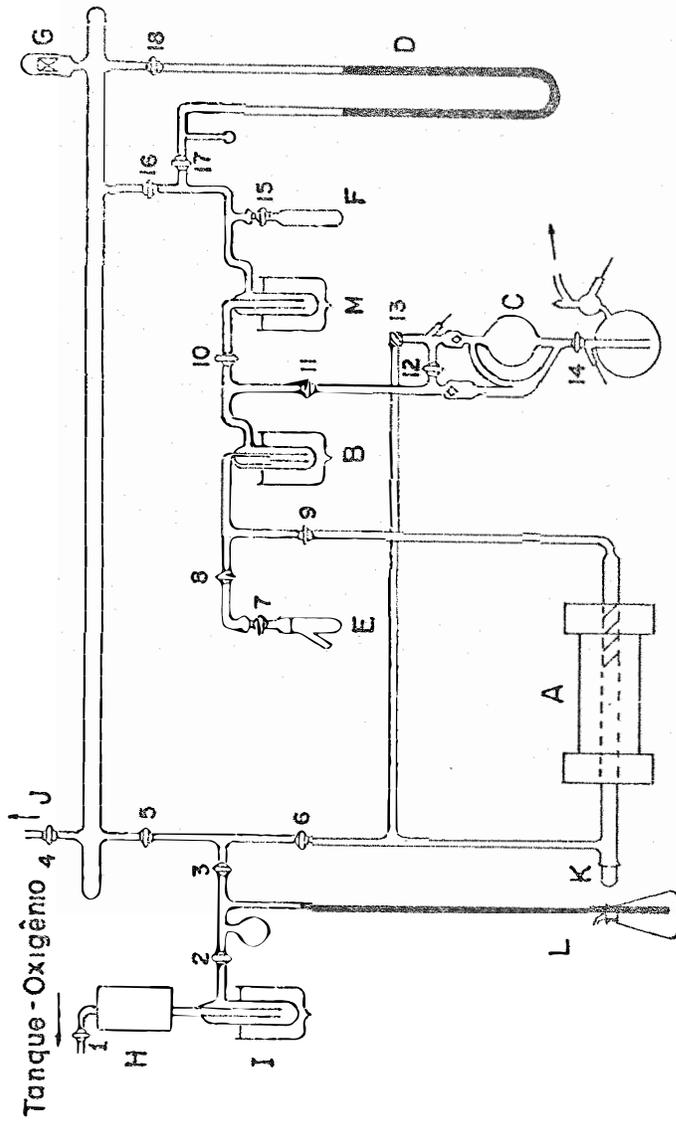


Figura 4 - Sistema de preparo do dióxido de carbono

Fonte: CRAIG (1953)

mente, através do outro forno de combustão (H), o qual continha CuO a 700°C, e um "trap" (I) a -190°C.

No preparo do dióxido de carbono por decomposição ácida sob vácuo neste mesmo sistema, segundo *CRAIG (1953)*, a amostra carbonatada reagia com ácido ortofosfórico a 100% no balão de reação (E), purificada pelo "trap" (B) e condensada a -190°C no "trap" (M). O critério usado em ambas as operações de preparo eram: a capacidade de conversão total do carbono, presente na amostra, a dióxido de carbono e a comparação dos resultados, para a obtenção de uma precisão desejada. Sob estes critérios, as variações na razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ foram determinadas com precisão de $\pm 0,1\text{‰}$.

CRAIG (1957), não encontrou nenhuma relação entre a temperatura de combustão da matéria orgânica, conduzida entre 800 a 1000°C, e a composição isotópica do dióxido de carbono obtido, indicando que o fracionamento isotópico do ^{18}O desaparecia a 800°C. Relatou entretanto, que sem haver colocado oxigênio no sistema sob vácuo, o oxigênio do CO_2 trocava diretamente com o oxigênio do CuO a 550°C, citando *TITANI et alii (1942)*, os quais mostraram que a reação de troca isotópica entre CuO e CO_2 para o oxigênio, começava em torno de 400°C.

PARK e EPSTEIN (1960), relataram que o carbono da matéria orgânica foi convertido a dióxido de carbono, pelo processo de combustão, de acordo com o procedimento descrito por *CRAIG (1953)*, sendo a amostra orgânica queimada sob CuO em atmosfera de oxigênio à temperatura de 800-900°C. Após a circulação dos gases através do tubo de combustão, com uma bomba Toepler automática, por um tempo de 30 minutos, o dióxido de carbo-

no então produzido, era coletado num "trap" a -190°C e o excesso de oxigênio, bombeado para fora do sistema. Tal procedimento, juntamente com a análise isotópica da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ efetuada por espectrometria de massa, permitiram a precisão de $\pm 0,1^{\circ}/\text{oo}$ nos dados obtidos.

MOOK (1968), desenvolveu um sistema de combustão simples, em relação aos demais, no preparo do dióxido de carbono, a partir de matéria orgânica, o qual é esquematizado na Figura 5.

O sistema proposto por *MOOK (1968)*, consistiu-se essencialmente de duas partes distintas. Uma, relativa à limpeza do O_2 proveniente de cilindro e conduzida através da válvula de segurança (1) e "trap" com NaOH (2). O oxigênio, uma vez descontaminado de CO_2 , passava vagarosamente por um estrangulamento (locação física não especificada) e a seguir, por todo o sistema, sob pressão de mais de uma atmosfera, sendo continuamente bombeado para fora da linha (12). A segunda parte, referia-se à combustão da amostra, sob a temperatura de chama, conduzida por intermédio da naveta de platina, contendo material orgânico (4), lã de quartzo a 400°C (5) e óxido de cobre granulado a 900°C (6). A mistura gasosa uma vez obtida, circulava vagarosamente através da solução de KMnO_4 (8), "trap" a -80°C (9), e finalmente o CO_2 produzido pela combustão era condensado no "trap" duplo a -190°C (10) e posteriormente transferido para o balão de amostra (11).

Na análise de carbono presente em amostras lunares, *FRIEDMAN et alii (1970)* relataram que a amostra foi misturada com aproximadamente a metade de seu peso, com CuO previamente queimado, e a mistura resultante, queimada à temperatura de 950°C sob O_2 a uma atmosfera de pressão. O

- 1: Válvula de segurança
- 2: "Trap" com solução de NaOH
- 3: Manômetro
- 4: Naveta de platina com amostra
- 5: Lã de quartzo a 400°C
- 6: CuO a 900°C
- 7: Lã de prata a 400°C
- 8: Recipiente com solução de KMnO_4 (60g/ℓ)
- 9: "Trap" a -80°C
- 10: "Trap" duplo a -190°C
- 11: Balão de amostra
- 12: Linha de vácuo

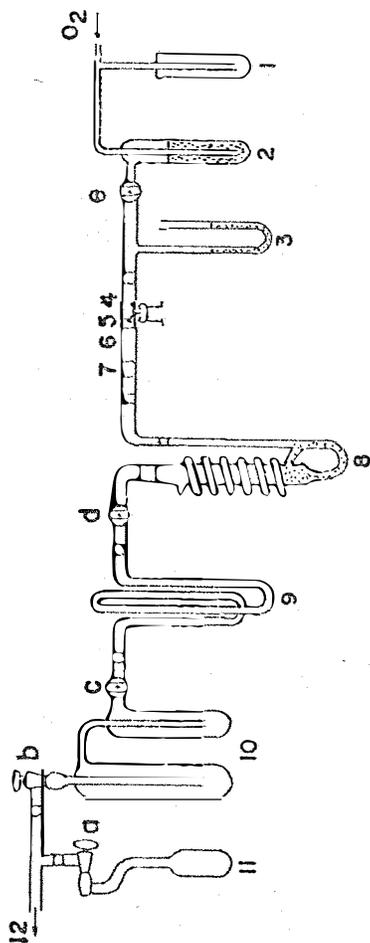


Figura 5 - Sistema de combustão do carbono

Fonte: MOOK (1968)

dióxido de carbono coletado foi analisado para as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, por espectrometria de massa, com precisão de $\pm 0,2^{\circ}/\text{oo}$.

Material de plantas em sua maioria folhas verdes, segundo *SMITH e EPSTEIN (1971)*, foram secas ao ar à temperatura ambiente, queimadas a 800°C sob excesso de oxigênio, e a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do CO_2 obtido, medido com precisão de $\pm 0,1^{\circ}/\text{oo}$ por espectrometria de massa. Repetições da amostragem, segundo os mesmos autores, incluindo todos os erros de preparo da amostra até a análise, sob condições de rotina, apresentaram precisão de $\pm 0,5^{\circ}/\text{oo}$.

WIESBERG (1974) relatou que o carbono para as medidas da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, por espectrometria de massa, foi medido preferencialmente na forma de dióxido de carbono, devido à simplicidade de transformação da amostra. Desenvolveu um sistema de preparo de dióxido de carbono, a partir do modelo proposto por *CRAIG (1953)* - como ilustra a figura 6 - para a obtenção do CO_2 a partir, tanto de amostras orgânicas por combustão, como amostras carbonatadas por decomposição ácida sob vácuo.

O sistema a vácuo proposto por *WIESBERG (1974)*, consistia, essencialmente, de três partes distintas: uma relativa a purificação do O_2 utilizado na combustão da matéria orgânica, o qual era descontaminado através dos "traps" de purificação (W_1 a W_5), forno elétrico (O_I) com CuO , serpentina (F) a -190°C e cilindro de armazenamento do O_2 purificado (O). A segunda, referia-se à combustão da amostra orgânica propriamente dita, conduzida através do forno elétrico (O_{II}) com CuO a 800°C , "traps" de limpeza do CO_2 (F_1 a F_3) e uma bomba Toepler automática (C), para a circulação dos gases. A terceira parte do sistema, referia-se a obtenção

- W₁ e W₄ : "Traps"
- W₂ e W₃ : "Traps" com Ba(OH)₂
- W₅ : "Trap" com H₂SO₄ conc.
- E : Tubo com asbestos
- O_I : Forno com CuO
- F : Serpentina a -190°C
- D : Cilindro com O₂ purificado
- M₁ e M₂ : Manômetros
- O_{II} : Forno com CuO a 800°C
- F₁ e F₆ : "Traps" a -80°C
- F₁, F₂ e F₃ : "Traps" a -190°C
- F₄ e F₅ : "Traps" a -190°C
- F₇ : Balão de amostra
- P₁, P₂, P₃, P₄ : Medidores de vácuo
- C : Bomba Toepler automática
- O₁ e D₂ : Bombas de difusão
- B : Ampolas de vidro
- H₁ a H₁₉ : Torneiras do sistema
- A : Recipiente com H₃PO₄ a 100%

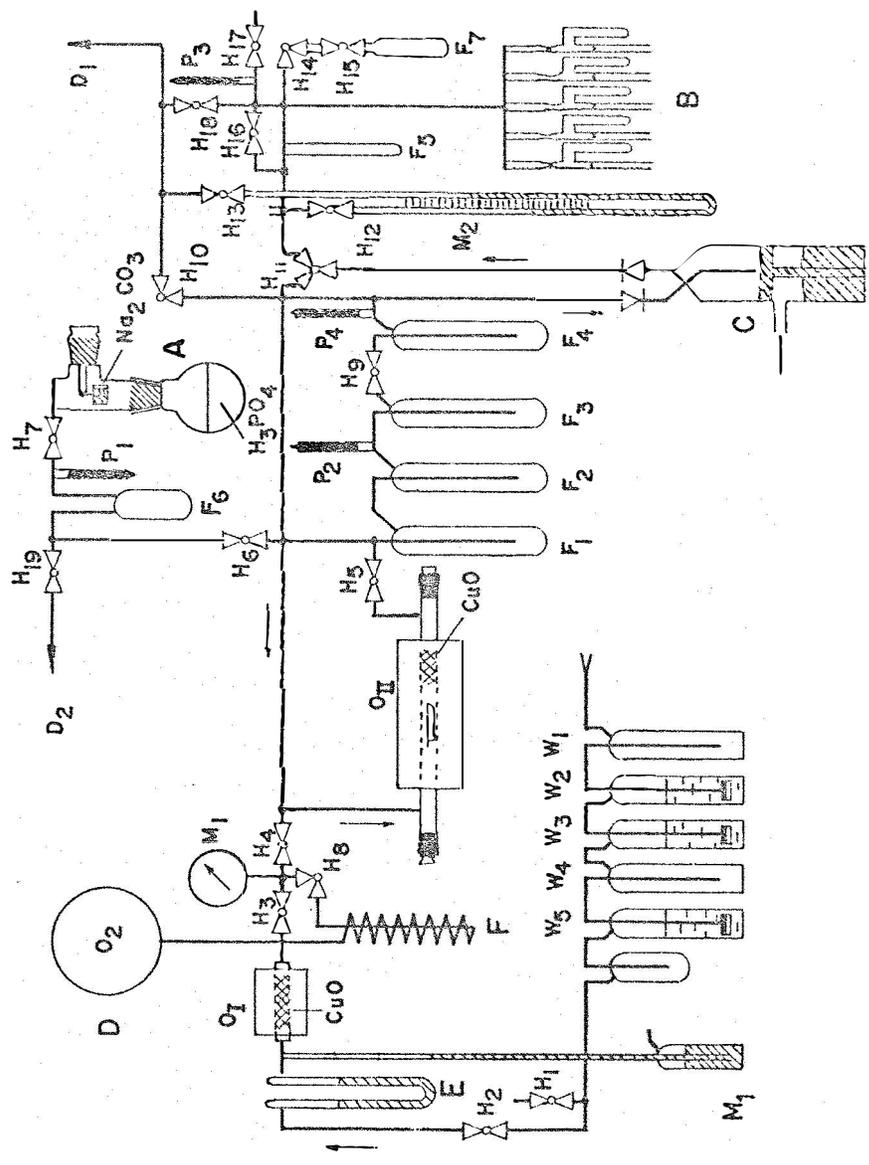


Figura 6: Sistema de preparo do dióxido de carbono

Fonte: WIESBERG (1974)

do CO_2 a partir de material carbonatado por decomposição ácida com H_3PO_4 a 100%, conduzida no balão de reação apropriado (A) sob condições de vácuo, "trap" de purificação (F_6) e "traps" de retenção do CO_2 obtido (F_1 a F_3). Em ambos os sistemas acoplados, de obtenção do dióxido de carbono, segundo o autor, o CO_2 era recebido e guardado em ampolas de vidro (B) por prazo indeterminado. Sob estes aspectos de preparo, as amostras queimadas foram analisadas por espectrometria de massa com precisão de $\pm 0,1^0/00$.

PARDUE et alii (1976) relataram que o dióxido de carbono foi obtido a partir da combustão da matéria orgânica sob sistema a vácuo, modificado segundo o modelo proposto por *CRAIG (1953)*, permitindo medidas na razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ por espectrometria de massa, com precisão da ordem de $\pm 0,2^0/00$.

3.4. Método de preparo do padrão por decomposição ácida

Devido à não existência de um padrão isotópico internacional para as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da matéria orgânica, segundo *SALATI (1976)*⁽¹⁾, normalmente as comparações isotópicas relativas do dióxido de carbono da matéria orgânica, são efetuadas em relação às razões isotópicas do CO_2 obtido a partir da decomposição ácida de carbonato.

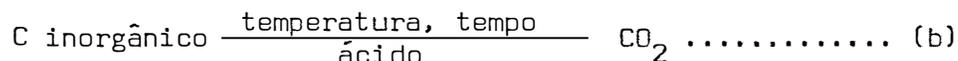
Inúmeros autores, entre eles *PARK e EPSTEIN (1960)*, *PARK e EPSTEIN (1961)*, *BENDER (1968)*, *SMITH e EPSTEIN (1970)*, *SMITH e EPSTEIN (1971)*, *TROUGHTON et alii (1974a)*, *WIESBERG (1974)* e *PARDUE et alii (1976)*

(1) Comunicação pessoal

compararam as razões isotópicas da matéria orgânica, em relação às razões isotópicas do dióxido de carbono, obtido a partir do carbonato padrão internacional, denominado de PDB, o qual se trata de Belemnitela cretáceous, Belemnitela americana, da formação Peedee do Sul da Carolina, empregado inicialmente como padrão por *CRAIG (1957)*.

MACCREA (1950) relatou que durante o preparo do dióxido de carbono pelo processo de decomposição ácida e decomposição térmica, encontrou uma diferença de 6⁰/oo entre os métodos empregados, observando que a cinética da decomposição térmica, conduzida a 1000⁰C não permitia a precisão desejada nos valores isotópicos dos carbonatos.

A obtenção do dióxido de carbono, a partir de minerais carbonatados segundo *MACCREA (1950)*, baseava-se na conversão total do carbono inorgânico a CO₂ - equação (b) - na qual os compostos carbonatados reagiam com um ácido específico sob temperatura e tempo controlados.



No sistema a vácuo, da decomposição ácida de carbonato -*Figura 7* - o autor testou diversos ácidos, entre eles: ácido nítrico, fórmico, perclórico, sulfúrico e fosfórico, dos quais, elegeu o ácido fosfórico com concentração de 95%, como o mais indicado na conversão completa do carbonato a dióxido carbono. O ácido nessa concentração era obtido com a adição de pentóxido de fósforo ao ácido fosfórico de concentração 85%.

- A : Balão de reação com dois braços, um principal, na posição vertical, contendo carbonato moído (40 a 100mg) e outro secundário (inclinado), contendo de 5 a 10cc de ácido fosfórico a 95%
- B : "Trap" em forma de U a -190°C
- C : "Trap" acoplado ao medidor de vácuo (F)
- D : Manômetro de Hg
- E : Balão de amostra
- 1 a 5 : Torneiras do sistema

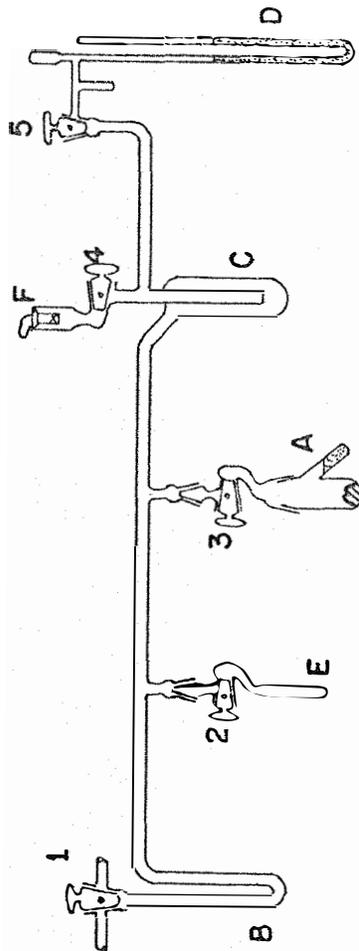


Figura 7 - Sistema de preparo do CO_2 a partir da decomposição ácida de carbonato.

Fonte: *MACCREA (1950)*

O sistema proposto por *MACCREA (1950)* era manipulado em três etapas distintas. Na primeira, era feito vácuo, no balão de reação (A) com os respectivos reagentes, via bomba de difusão. Na segunda, conduzida fora do sistema, o ácido existente no braço secundário (inclinado) do balão de reação (A) sob vácuo, reagia com o carbonato existente no braço principal pela simples inclinação do balão. A reação processava-se por um tempo de 30 minutos a 25°C. Nestas condições controladas, segundo o autor, a variação na composição isotópica do CO₂ era desprezível.

Na última etapa, o dióxido de carbono obtido, expandia-se para todo o sistema sob vácuo, condensado no "trap" (B) para limpeza, medido no manômetro (D) e novamente condensado a -190°C no balão de amostra (E), para posterior análise por espectrometria de massa com precisão de ±0,1‰.

UREY et alii (1951) relataram que o dióxido de carbono das amostras carbonatadas foi obtido pela reação a vácuo com ácido ortofosfórico a 100%, concentração essa, obtida pela adição, sob aquecimento, de pentóxido de fósforo, óxido crômico e peróxido de hidrogênio, ao ácido comercial a 85%. Segundo o autor, aproximadamente 9cc do ácido preparado e 50mg de carbonato de cálcio, foram colocados em braços distintos no balão de reação apropriado sob vácuo, à temperatura de 25°C. Após a reação nessa temperatura, por meia hora, o dióxido de carbono foi analisado tendo-se como padrão o CO₂ do carbonato PDB.

CRAIG (1953), relatou os mesmos procedimentos utilizados por *MACCREA (1950)* e *UREY et alii (1951)* na obtenção do dióxido de carbono, a partir da decomposição do CaCO₃, desenvolvendo um sistema de prepara-

ro a vácuo, descrito no ítem 3.3.

CRAIG (1954a) e CRAIG (1954b), relataram que suas amostras orgânicas foram analisadas contra o padrão calcário marinho. Entretanto, *CRAIG (1957)*, nas medidas básicas dos padrões isotópicos para carbono e oxigênio, utilizou como referência o padrão internacional PDB, o qual reagiu com H_3PO_4 na concentração de 100% a $25,2^{\circ}C$. Relatou, também, que o carbonato não sofria nenhum tratamento "a priori", a não ser trituração e moagem.

O dióxido de carbono, obtido a partir da decomposição ácida de carbonatos, segundo *PARK e EPSTEIN (1960)*, foi conseguido de acordo com os procedimentos utilizados por *MACCREA (1950)*, sendo que, o ácido fosfórico (100%) colocado em um dos braços do balão de reação sob vácuo, reagia por uma hora, com o carbonato de cálcio colocado inicialmente no outro braço do referido balão.

EPSTEIN et alii (1963), baseados na ação seletiva do ácido fosfórico, em mistura de calcita e dolomita, obtiveram valores distintos na simbologia δ -Tabela 4 - visualizando melhor o tempo dispendido na reação de obtenção do CO_2 , por decomposição ácida.

Tabela 4 - Comparação dos valores $\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}/\text{OO}}$ do CO_2 obtido por decomposição ácida.

Amostra	Tempo de reação (horas)	$\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}/\text{OO}18\text{O}/16\text{O}}$	$\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}/\text{OO}13\text{C}/12\text{C}}$
dolomita pura	72	+20,7	-1,8
calcita pura	24	+31,6	-0,9
mistura 1:1	0-1	+31,4	-1,1
1:1	4-7	+20,7	-1,9

Fonte: *EPSTEIN et alii (1963)*

Os mesmos autores, indicaram que o dióxido de carbono, liberado durante a primeira hora de reação da mistura (1:1) de calcita e dolomita com o ácido, apresentava essencialmente o mesmo valor em $\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}/\text{OO}18\text{O}/16\text{O}}$ da calcita pura, e que o CO_2 liberado durante o intervalo de 4 a 72 horas, apresentava o mesmo valor $\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}/\text{OO}18\text{O}/16\text{O}}$ em relação a dolomita pura. Semelhante observação é perfeitamente análoga para os valores em $\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}/\text{OO}13\text{C}/12\text{C}}$.

MOOK (1968), questionou o uso do ácido fosfórico a 100% no preparo do dióxido de carbono a partir de amostra de calcário, especialmente as impuras, uma vez que a reação ácida não se completava sob o tempo de 24 horas. Indicou o H_3PO_4 a 95% como a concentração mais adequada no fornecimento de resultados isotópicos consistentes. Tal concentração era obtida pela adição de quantidades calculadas de P_2O_5 ao ácido comercial (85%), sob a temperatura de 150°C , conduzida por muitas horas.

O mesmo autor afirmou que, a existência da pequena quantidade de água no ácido não influenciava na análise isotópica, indicando ainda, que a amostra carbonatada era triturada, moída, pesada e preservada em dissecador sob vácuo, para posterior reação por decomposição ácida. Sob estes procedimentos, obteve nos dados isotópicos precisão da ordem de $\pm 0.1^{\circ}/\text{oo}$.

DE GIOVANI et alii (1974), relataram que as amostras dolomíticas após a limpeza da matéria orgânica sob fluxo de Hélio a 470°C por 20 minutos, reagiam com ácido fosfórico a 100% e que o dióxido de carbono liberado na reação ácida durante as primeiras quatro horas foi bombeado para fora do balão de reação, utilizando-se do CO_2 liberado no intervalo de 4 a 72 horas na análise do $\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}}/18\text{O}/16\text{O}$ e $\delta_{\text{PDB}}^{\text{C}}/13\text{C}/12\text{C}$.

WIESBERG (1974) desenvolveu um sistema de preparo do dióxido de carbono a partir de carbonato de sódio, descrito no item 3.3., no qual reagia Na_2CO_3 com H_3PO_4 a 100%, concentração essa, obtida da dissolução de P_2O_5 com ácido H_3PO_4 a 70%.

O mesmo autor, frisou que o controle da temperatura na decomposição ácida não era crítico, uma vez que obteve uma constância na proporção dos isótopos de oxigênio, a qual, servia apenas como fator corretivo na análise de $\delta_{\text{PDB}}^{\text{C}}/13\text{C}/12\text{C}$. Relatou ainda que, as variações isotópicas obtidas na decomposição ácida do carbonato eram provavelmente atribuídas à falta de uma melhor homogeneização no carbonato de sódio, empregado como "padrão secundário".

DUCATTI (1975) na análise das razões isotópicas naturais

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em carbonato "Bahia" e dióxido de carbono comercial, verificou que o desvio padrão era da ordem de $0,3^{\circ}/\text{oo}$, valor este relativamente superior ao especificado pela máquina ($0,04^{\circ}/\text{oo}$), mas satisfatório, segundo o autor, nas medidas das razões isotópicas naturais do dióxido de carbono.

Observa-se conseqüentemente que a maioria dos autores citados, utilizaram-se de padrões intermediários na correlação dos valores de $\delta^{\circ}/\text{oo} \ ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra com o $\delta^{\circ}/\text{oo} \ ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do padrão internacional PDB. Tais padrões são comumente designados de "padrão de trabalho" na análise isotópica do carbono. Esse procedimento é decorrente da facilidade de trabalho empregado, bem como de razões de ordem técnica ou analítica não especificada.

• "padrão de trabalho" utilizado por SALATI (1976)⁽¹⁾ nas medidas relativas da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em amostras orgânicas, era o CENA-std, uma rocha carbonatada (mármore) com alta pureza em calcita, com a seguinte composição isotópica, ilustrada na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores isotópicos do "padrão de trabalho" CENA-std em relação ao padrão internacional PDB

"Padrão de trabalho"	$\delta^{\circ}/\text{oo} \ ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ δ_{PDB}	$\delta^{\circ}/\text{oo} \ ^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ δ_{PDB}
CENA-std	+1,90	-1,63

Fonte: SALATI (1976)⁽¹⁾

(1) Comunicação pessoal

O padrão isotópico internacional PDB, segundo *PARK e EPSTEIN (1960)*, é o ponto de referência na escala PDB - Figura 8 - a qual reflete o quanto um dado valor positivo obtido na razão isotópica da amostra, é "mais pesado" ou "maior" que o PDB e, um dado valor negativo é "menor" ou mais "leve" que o ponto de referência.

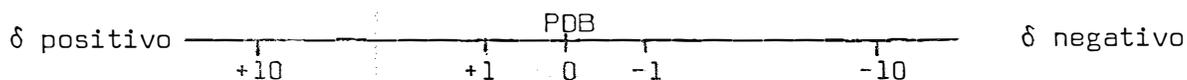


Figura 8 - Escala isotópica PDB

Fonte: *SALATI (1976)* (1)

Assim o valor positivo em $\delta^0/00$ de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - Tabela 5 - reflete isotopicamente segundo a escala, que o CENA-std é 1,90 per mil "maior" que o padrão PDB, e o valor negativo em $\delta^0/00$ de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ indica que o "padrão de trabalho" é 1,63 per mil "menor" que o ponto de referência.

No intervalo de zero a δ positivo ou de zero a δ negativo da escala PDB - Figura 8 - é comum também expressar o valor da razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$), de uma amostra em relação a outra, em termos de "alto" ou "baixo" valor isotópico. Assim, o valor -1 é "alto" em relação a -10, e o valor +1 é um "baixo" valor em relação a +10.

Na mudança arbitrária do ponto de referência (p.r.), para

(1) Comunicação pessoal

a esquerda ou à direita do ponto zero da escala PDB, no intervalo de δ positivo ou δ negativo sob fator 1000, tem-se que o valor isotópico +1 é 2⁰/oo "mais pesado" que o valor -1, se considerarmos este último como p.r., e 9⁰/oo "mais leve" com relação a +10 (p.r.).

Desde que, as variações isotópicas de ocorrência natural não são maiores do que alguns por cento para todos os isótopos, segundo *BOATO (1964)*, o valor numérico δ da escala arbitrária é dividida por um fator de 100 ou 1000, fornecendo valores de $\delta\%$ ou δ^0 /oo respectivamente. Segundo o autor, pode-se expressar qualquer variação natural da abundância isotópica em relação ao padrão, quantificando-a em termos de δ que é definida na equação (c), onde os "R" representam a razão do isótopo mais pesado pelo isótopo mais leve, do par isotópico tomado em consideração.

$$\delta = \frac{R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}}{R_{\text{padrão}}} \dots\dots\dots (c)$$

Para a maioria dos problemas geoquímicos, segundo *FRIEDMAN e O'NEIL (1977)*, o conhecimento da diferença na razão isotópica absoluta entre duas substâncias é suficiente, adicionado pelo fato das diferenças serem medidas com melhor precisão do que as razões absolutas, consequentemente, essa diferença, ou o valor δ , é usada quase que exclusivamente nas ciências Geológicas para reportar a abundância dos isótopos estáveis e suas variações naturais, sendo que, tal conceito é perfeitamente análoga à ciências Biológicas.

4. METODOLOGIA

4.1. Fundamentos teóricos de análise da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ por espectrometria de massa

A determinação da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em matéria orgânica, segundo *BARNARD (1953)* requer, principalmente, o preparo de um composto gasoso do carbono, sendo o mais satisfatório para esta análise, o dióxido de carbono.

Quando o dióxido de carbono é introduzido no sistema de admissão do espectrômetro de massa e, após percorrer os caminhos esquemáticos da Figura 9, tem-se um espectro de massa cujos ions são mostrados na Tabela 6.

Segundo *RANKAMA (1956)* os ions moleculares mais abundantes do dióxido de carbono - Figura 10 - são constituídos dos isótopos de carbono e oxigênio e fornecem o espectro de massa de 44 a 46. A probabilidade de formação do CO_2^+ é muito maior que qualquer outro ion, e consequentemente este ion é geralmente usado para a comparação da abundância relativa dos isótopos ^{12}C e ^{13}C ; ^{16}O e ^{18}O .

Sistema de admissão: a amostra na forma gasosa, é admitida no aparelho.

Fonte de ionização: as moléculas gasosas são transformadas em ions através da fonte de ionização, por impacto de elétrons.

Analizador: os feixes de ions são separados e focalizados de acordo com a relação massa/carga.

Detector: os feixes iônicos são transmutados em impulsos elétricos, para a análise isotópica.

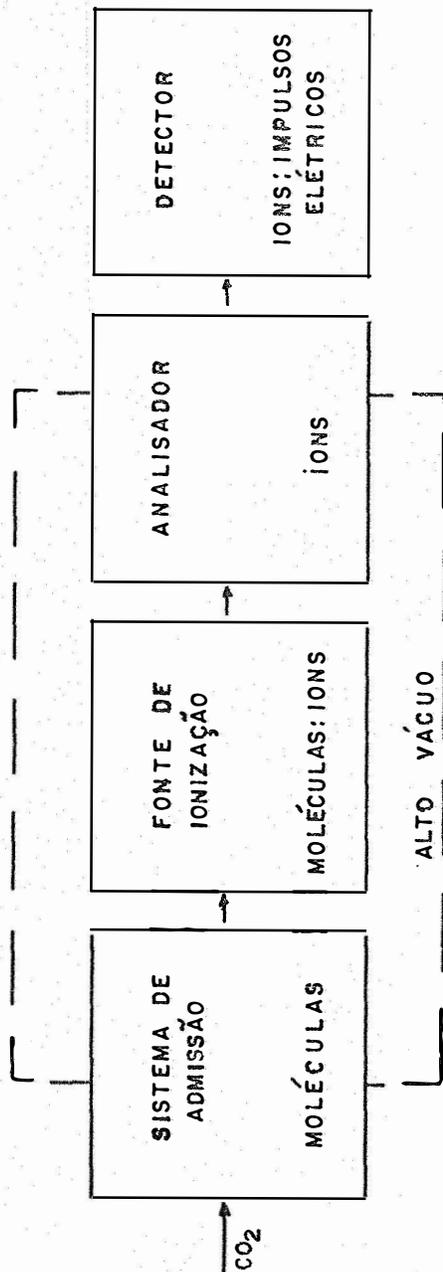


Figura 9 - Diagrama geral em blocos, do espectrômetro de massa

Fonte: DUCATTI (1973)

A relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pode ser obtida diretamente da razão das intensidades de correntes, devido às massas 12 e 13 que são melhores resolvidas do que as intensidades das massas 44, 45 e 46, as quais, são constituídas das combinações dos isótopos de carbono com os de oxigênio. Em contrapartida, as intensidades dos feixes de massa 12 e 13 são consideravelmente menores, por um fator 50, comparativamente a intensidade dos ions moleculares.

Segundo *BARNARD (1953)*, as massas 44 e 45 são geralmente usadas para determinar a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, e a contribuição dos ions $\left\{^{12}\text{C} \ ^{16}\text{O} \ ^{17}\text{O}\right\}^+$ pode ser desprezada, desde que a abundância natural do ^{17}O é somente 0,04%.

Tabela 6 - Ions positivos observados na análise isotópica do dióxido de carbono

Número de massa	Ions
12	$\left\{^{12}\text{C}\right\}^+$
13	$\left\{^{13}\text{C}\right\}^+$
16	$\left\{^{16}\text{O}\right\}^+$
17	$\left\{^{17}\text{O}\right\}^+$
18	$\left\{^{18}\text{O}\right\}^+$
22	$\left\{^{12}\text{C} \ ^{16}\text{O} \ ^{16}\text{O}\right\}^{++}$
28	$\left\{^{12}\text{C} \ ^{16}\text{O}\right\}^+$
29	$\left\{^{13}\text{C} \ ^{16}\text{O}\right\}^+$ e $\left\{^{12}\text{C} \ ^{17}\text{O}\right\}^+$
30	$\left\{^{12}\text{C} \ ^{18}\text{O}\right\}^+$
44	$\left\{^{12}\text{C} \ ^{16}\text{O} \ ^{16}\text{O}\right\}^+$
45	$\left\{^{13}\text{C} \ ^{16}\text{O} \ ^{16}\text{O}\right\}^+$ e $\left\{^{12}\text{C} \ ^{16}\text{O} \ ^{17}\text{O}\right\}^+$
46	$\left\{^{12}\text{C} \ ^{16}\text{O} \ ^{18}\text{O}\right\}^+$

Fonte: *BARNARD (1953)*

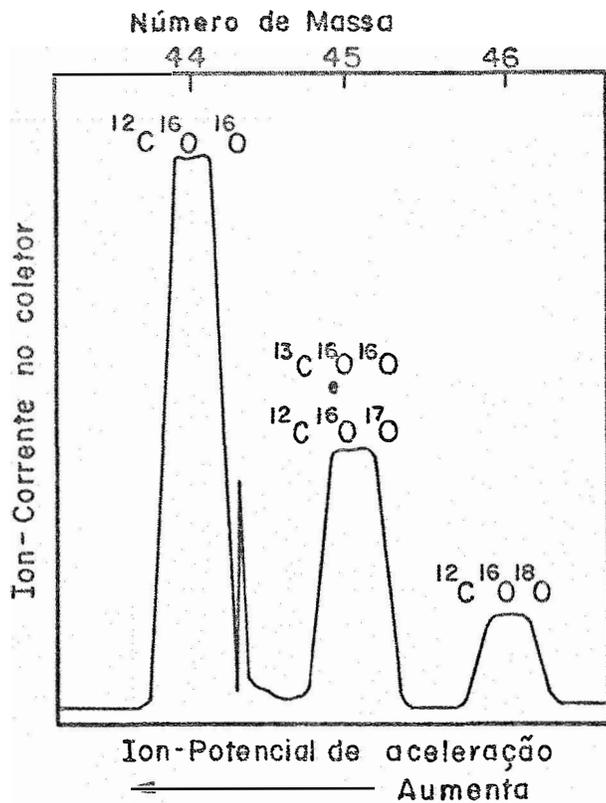


Figura 10 - Espectro de massa do dióxido de carbono de 44 a 46

Fonte: RANKAMA (1956)

4.1.1. Desenvolvimento analítico, da equação isotópica, para a análise da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, do dióxido de carbono em relação ao padrão internacional PDB

Inicialmente, adotou-se a seguinte simbologia:

$$R_{13} = \frac{\left(^{13}\text{C} \right)}{\left(^{12}\text{C} \right)} \dots\dots\dots (1)$$

$$R_{17} = \frac{\left(\begin{matrix} 16_0 & 17_0 \\ 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)}{\left(\begin{matrix} 16_0 & 16_0 \\ 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)} \dots \dots \dots (2)$$

$$R_{18} = \frac{\left(\begin{matrix} 16_0 & 18_0 \\ 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)}{\left(\begin{matrix} 16_0 & 16_0 \\ 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)} \dots \dots \dots (3)$$

$$R_{45} = R_{13} + R_{17} \dots \dots \dots (4)$$

$$R_{45} = \frac{\left(\begin{matrix} 13_C \\ 12_C \end{matrix} \right) + \left(\begin{matrix} 16_0 & 17_0 \\ 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)}{\left(\begin{matrix} 16_0 & 16_0 \\ 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)} = \frac{\left(\begin{matrix} 13_C & 16_0 & 16_0 \\ 12_C & 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right) + \left(\begin{matrix} 12_C & 16_0 & 17_0 \\ 12_C & 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)}{\left(\begin{matrix} 12_C & 16_0 & 16_0 \\ 12_C & 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)}$$

$$R_{45} = \frac{\text{Número de ions de massa 45 coletado}}{\text{Número de ions de massa 44 coletado}}$$

x = subscrito referente à amostra (5)

std = subscrito referente ao padrão (6)

Na análise do carbono coleta-se simultaneamente, as massas 44 e 45, e a razão é dada por:

$$R_{45} = \frac{\left(\begin{matrix} 13_C & 16_0 & 16_0 \\ 12_C & 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right) + \left(\begin{matrix} 12_C & 16_0 & 17_0 \\ 12_C & 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)}{\left(\begin{matrix} 12_C & 16_0 & 16_0 \\ 12_C & 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)}$$

Segundo *CRAIG (1957)*, a concentração $\left(\begin{matrix} 12_C & 16_0 & 17_0 \\ 12_C & 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)$ é da ordem de 7% da $\left(\begin{matrix} 13_C & 16_0 & 16_0 \\ 12_C & 16_0 & 16_0 \end{matrix} \right)$ e da ordem de 6,5% do feixe de ions de massa 45.

A variação natural em per mil da abundância isotópica é expressa em delta (δ), isto é:

$$\delta \left(\frac{O}{OO} \right) = \left(\frac{R_{(x)}}{R_{(std)}} - 1 \right) \cdot 10^3 \dots\dots\dots (7)$$

Distinguimos duas funções delta:

$$\delta_m = \text{valor calculado, a partir das razões de massas moleculares coletadas} \dots\dots\dots (8)$$

$$\delta_c = \text{valor verdadeiro da amostra relativa ao padrão} \dots\dots\dots (9)$$

As funções delta são:

$$\delta_m = R_{45} (x) / R_{45} (std) - 1 \dots\dots\dots (10)$$

$$\delta_c = R_{13} (x) / R_{13} (std) - 1 \dots\dots\dots (11)$$

$$\delta^{18}O = R_{18} (x) / R_{18} (std) - 1 \dots\dots\dots (12)$$

Da equação (4), tem-se que:

$$R_{45} = R_{13} + R_{17}$$

isolando R_{13} e adicionando o subscrito (x),

$$R_{13}(x) = R_{45}(x) - R_{17}(x)$$

substituindo na equação (11),

$$\delta_c + 1 = \frac{R_{13}(x)}{R_{13}(\text{std})} = \frac{R_{45}(x) - R_{17}(x)}{R_{13}(\text{std})}$$

isolando $R_{45}(x)$, chega-se a:

$$R_{45}(x) = (\delta_c + 1) \cdot R_{13}(\text{std}) + R_{17}(x) \dots\dots\dots (13)$$

como,

$$\delta_m + 1 = \frac{R_{45}(x)}{R_{45}(\text{std})}$$

e isolando $R_{45}(x)$, tem-se que:

$$R_{45}(x) = (\delta_m + 1) \cdot R_{45}(\text{std}) \dots\dots\dots (14)$$

Igualando as equações (13) e (14), obtém-se:

$$(\delta_m + 1) \cdot R_{45}(\text{std}) = (\delta_c + 1) \cdot R_{13}(\text{std}) + R_{17}(x)$$

ou,

$$\delta_m \cdot R_{45}(\text{std}) + R_{45}(\text{std}) = \delta_c \cdot R_{13}(\text{std}) + R_{13}(\text{std}) + R_{17}(x)$$

ou ainda,

$$\delta_c \cdot R_{13} \text{ (std)} = \delta_m \cdot R_{45} \text{ (std)} + R_{45} \text{ (std)} - R_{13} \text{ (std)} - R_{17} \text{ (x)} \dots (15)$$

Com as considerações feitas na equação (4), tem-se que:

$$R_{45} \text{ (std)} = R_{13} \text{ (std)} + R_{17} \text{ (std)} \dots (16)$$

Substituindo a equação (16) no termo não multiplicativo $R_{45} \text{ (std)}$ da equação (15), tem-se que:

$$\delta_c \cdot R_{13} \text{ (std)} = \delta_m \cdot R_{45} \text{ (std)} + R_{13} \text{ (std)} + R_{17} \text{ (std)} - R_{13} \text{ (std)} - R_{17} \text{ (x)}$$

ou,

$$\delta_c \cdot R_{13} \text{ (std)} = \delta_m \cdot R_{45} \text{ (std)} + R_{17} \text{ (std)} - R_{17} \text{ (x)}$$

ou ainda,

$$\delta_c = \frac{\delta_m \cdot R_{45} \text{ (std)} + R_{17} \text{ (std)} - R_{17} \text{ (x)}}{R_{13} \text{ (std)}} \dots (17)$$

Segundo *CRAIG (1954) e CRAIG (1957)*:

$$\left(\frac{R_{17} \text{ (x)}}{R_{17} \text{ (std)}} \right)^2 = \frac{R_{18} \text{ (x)}}{R_{18} \text{ (std)}} \dots (18)$$

Comparando a equação (18) com a equação (12), tem-se que:

$$\delta^{18}_0 + 1 = \frac{R_{18}(x)}{R_{18}(\text{std})} = \left(\frac{R_{17}(x)}{R_{17}(\text{std})} \right)^2$$

ou,

$$(1 + \delta^{18}_0)^{1/2} = \frac{R_{17}(x)}{R_{17}(\text{std})} \dots \dots \dots (19)$$

Através do binômio de Newton

$$(1 + x)^p = 1 + px + \frac{p(p-1)x^2}{2!} + \frac{p(p-1)(p-2)x^3}{3!} + \dots$$

desenvolve-se a equação (19), ou seja:

$$\begin{aligned} \frac{R_{17}(x)}{R_{17}(\text{std})} &= 1 + 1/2 \cdot \delta^{18}_0 + \frac{1/2(1/2-1)}{2!} \cdot (\delta^{18}_0)^2 + \\ &+ \frac{1/2(1/2-1)(1/2-2)}{3!} \cdot (\delta^{18}_0)^3 + \dots \end{aligned}$$

ou,

$$\frac{R_{17}(x)}{R_{17}(\text{std})} = 1 + 1/2 \cdot \delta^{18}_0 - 1/8 (\delta^{18}_0)^2 + 1/16 (\delta^{18}_0)^3 + \dots \dots \dots (20)$$

Desprezando o terceiro e os demais termos da equação (20),

tem-se que:

$$\frac{R_{17} (x)}{R_{17} (std)} \sim 1 + \frac{\delta^{18}O}{2} \dots \dots \dots (21)$$

Isolando $R_{17} (x)$ na equação (21), chega-se que:

$$R_{17} (x) = R_{17} (std) + R_{17} (std) \cdot \frac{\delta^{18}O}{2} \dots \dots \dots (22)$$

e substituindo a equação (22) na equação (17),

$$\delta_c = \frac{\delta_m \cdot R_{45} (std) + R_{17} (std) - R_{17} (std) - R_{17} (std) - \frac{\delta^{18}O}{2}}{R_{13} (std)}$$

ou,

$$\delta_c = \delta_m \cdot \left[\frac{R_{45} (std)}{R_{13} (std)} \right] - \left[\frac{R_{17} (std)}{2 \cdot R_{13} (std)} \right] \cdot \delta^{18}O \dots \dots \dots (23)$$

CRAIG (1957), no trabalho "Padrões isotópicos para carbono e oxigênio", obteve os seguintes resultados em relação ao padrão internacional PDB, para as razões isotópicas absolutas:

$$R_{13} (PDB) = 1123,72 \cdot 10^{-5}$$

$$R_{17} (PDB) = 75,99 \cdot 10^{-5}$$

$$R_{45} (PDB) = 1199,71 \cdot 10^{-5}$$

$$R_{18} (PDB) = 415,8 \cdot 10^{-5}$$

Substituindo estes valores na equação (23), na qual o subscrito (std) equivale ao subscrito (PDB), chega-se a equação (24).

$$\delta_c = \delta_m \cdot \left(\frac{1199,71 \cdot 10^{-5}}{1123,72 \cdot 10^{-5}} \right) - \left(\frac{75,99 \cdot 10^{-5}}{2 (1123,72 \cdot 10^{-5})} \right) \cdot \delta^{18}_O$$

ou,

$$\delta_{PDB}^{13C/12C} = 1,0676 \delta_m - 0,0338 \delta^{18}_O \dots \dots \dots (24)$$

O mesmo autor deduziu uma equação para análise do $^{18}_O$, a partir de:

$$1 + \delta_m = \frac{\left((1 + \delta_c) + \frac{(1 + \delta^{13}C) \cdot R_{13} \text{ (std)} \cdot (1 + \frac{\delta_c}{2}) \cdot R_{17} \text{ (std)}}{R_{18} \text{ (std)}} \right)}{\left(1 + \frac{R_{13} \text{ (std)} \cdot R_{17} \text{ (std)}}{R_{18} \text{ (std)}} \right)}$$

$$\frac{\left(1 + R_{13} \text{ (std)} + R_{17} \text{ (std)} \right)}{\left(1 + (1 + \delta^{13}C) \cdot R_{13} \text{ (std)} + (1 + \frac{\delta_c}{2}) \cdot R_{17} \text{ (std)} \right)} \dots \dots \dots (25)$$

na qual, substituindo os respectivos valores dos R, mudando o subscrito (std) para (PDB) e desprezando os produtos dos δ , chega-se a equação (26).

$$\delta_{PDB}^{18O/16O} = 1,0014 \delta_m + 0,009 \delta^{13}C \dots \dots \dots (26)$$

As equações (24) e (26) foram deduzidas em função do pa-

drão internacional PDB para a análise das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ respectivamente, cujos valores obtidos são dados em δ°/oo .

4.1.2. Desenvolvimento analítico, da equação isotópica, para a análise da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, do dióxido de carbono em relação ao "padrão de trabalho" CENA-std

Para a rotina normal de trabalho, adota-se o "padrão de trabalho" CENA-std, especificado no ítem 3.4. - Tabela 5 - o qual apresenta a seguinte composição isotópica em relação ao padrão internacional PDB:

$$\delta_{\text{PDB}}^{(\text{CENA})^{13}\text{C}/^{12}\text{C}} = +1,90 \dots\dots\dots (27)$$

$$\delta_{\text{PDB}}^{(\text{CENA})^{18}\text{O}/^{16}\text{O}} = -1,63 \dots\dots\dots (28)$$

Através das simbologias e equações $\left\{ (7), (4), (21), (18) \right\}$ e os respectivos valores dos R(PDB) empregados no ítem 4.1.1., calcula-se, inicialmente, os respectivos valores dos R(CENA).

Da equação (7),

$$\delta^{\circ}/\text{oo} = \left[\frac{R(x)}{R(\text{std})} - 1 \right] \cdot 10^3$$

substituindo os subscritos (x) e (std) por (CENA) e (PDB), respectivamente, tem-se que:

$$\delta_{\text{PDB}}^{(\text{CENA})13} = \frac{R_{13}(\text{CENA})}{R_{13}(\text{PDB})} - 1$$

e, substituindo o valor da equação (27), e o valor de $R_{13}(\text{PDB})$, tem-se:

$$0,0019 = \frac{R_{13}(\text{CENA})}{1123,72 \cdot 10^{-5}} - 1$$

ou,

$$R_{13}(\text{CENA}) = 1125,86 \cdot 10^{-5} \dots\dots\dots (29)$$

Na equação (4),

$$R_{45} = R_{13} + R_{17}$$

adicionando o subscrito (CENA), torna-se:

$$R_{45}(\text{CENA}) = R_{13}(\text{CENA}) + R_{17}(\text{CENA}) \dots\dots\dots (30)$$

Na equação (21),

$$\frac{R_{17}(x)}{R_{17}(\text{std})} = 1 + \frac{\delta_{\text{O}}^{18}}{2}$$

substituindo os subscritos (x) e (std) por(CENA) e (PDB), respectivamente, tem-se que:

$$\frac{R_{17} \text{ (CENA)}}{R_{17} \text{ (PDB)}} = 1 + \delta_{\text{PDB}}^{\text{(CENA)}} \frac{18_0}{2} \dots\dots\dots (31)$$

Substituindo o valor da equação (28) e o valor de R_{17} (PDB) na equação (31), tem-se que:

$$\frac{R_{17} \text{ (CENA)}}{75,99 \cdot 10^{-5}} = 1 + \frac{(-0,00103)}{2}$$

ou,

$$R_{17} \text{ (CENA)} = 75,93 \cdot 10^{-5} \dots\dots\dots (32)$$

Substituindo (29) e (32) na equação (30), obtém-se:

$$R_{45} \text{ (CENA)} = (1125,86 \cdot 10^{-5}) + (75,93 \cdot 10^{-5})$$

ou,

$$R_{45} \text{ (CENA)} = 1201,79 \cdot 10^{-5} \dots\dots\dots (33)$$

Na equação (18)

$$\left(\frac{R_{17} (x)}{R_{17} (std)} \right)^2 = \frac{R_{18} (x)}{R_{18} (std)}$$

substituindo os subscritos (x) e (std) por (CENA) e PDB), respectivamente, tem-se que:

$$\left(\frac{R_{17} (CENA)}{R_{17} (PDB)} \right)^2 = \frac{R_{18} (CENA)}{R_{18} (PDB)}$$

Substituindo os respectivos valores de R (CENA), obtém-se:

$$\left(\frac{75,93 \cdot 10^{-5}}{75,99 \cdot 10^{-5}} \right)^2 = \frac{R_{18} (CENA)}{415,8 \cdot 10^{-5}}$$

ou,

$$R_{18} (CENA) = 415,14 \cdot 10^{-5} \dots\dots\dots (34)$$

Reunindo os respectivos valores dos R (CENA), tem-se que:

$$R_{13} (CENA) = 1125,86 \cdot 10^{-5} \dots\dots\dots (29)$$

$$R_{17} (CENA) = 75,93 \cdot 10^{-5} \dots\dots\dots (32)$$

$$R_{45} (CENA) = 1201,79 \cdot 10^{-5} \dots\dots\dots (33)$$

$$R_{18} \text{ (CENA)} = 415,14 \cdot 10^{-5} \dots\dots\dots (34)$$

A substituição do subscrito (std) da equação (23) pelo subscrito (CENA) torna-se,

$$\delta_c = \delta_m \cdot \left[\frac{R_{45} \text{ (CENA)}}{R_{13} \text{ (CENA)}} \right] - \left[\frac{R_{17} \text{ (CENA)}}{2 \cdot R_{13} \text{ (CENA)}} \right] \cdot \delta^{18}_0 \dots\dots\dots (35)$$

e, substituindo agora os respectivos valores dos R (CENA) calculados, na equação (35), tem-se que:

$$\delta_{\text{CENA}}^{(x) 13} \text{C} = 1,0674 \delta_m - 0,0337 \delta^{18}_0 \dots\dots\dots (36)$$

Na equação (25) substituindo o subscrito (std) por (CENA), tem-se que:

$$1 + \delta_m = \frac{\left[(1 + \delta_c) + \frac{(1 + \delta^{13}\text{C}) \cdot R_{13} \text{ (CENA)} \cdot (1 + \frac{\delta_c}{2}) \cdot R_{17} \text{ (CENA)}}{R_{18} \text{ (CENA)}} \right]}{\left[1 + \frac{R_{13} \text{ (CENA)} \cdot R_{17} \text{ (CENA)}}{R_{18} \text{ (CENA)}} \right]} \dots\dots\dots (37)$$

$$\frac{\left[1 + R_{13} \text{ (CENA)} + R_{17} \text{ (CENA)} \right]}{\left[1 + (1 + \delta^{13}\text{C}) \cdot R_{13} \text{ (CENA)} + (1 + \frac{\delta_c}{2}) \cdot R_{17} \text{ (CENA)} \right]} \dots\dots\dots (37)$$

Substituindo os respectivos valores dos R (CENA) calcula-

dos na equação (37) e desprezando os produtos dos δ , obtém-se:

$$\delta_{\text{CENA}}^{(x) 18\text{O}} = 1,0014 \delta_m + 0,009 \delta^{13\text{C}} \dots \dots \dots (38)$$

As equações (36) e (38) deduzidas em função do "padrão de trabalho" CENA-std para a análise das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, respectivamente, fornecem valores em δ°/oo com relação ao CENA-std. Pode-se observar entretanto, que estas equações são quase semelhantes às equações (24) e (26), em virtude dos valores isotópicos do "padrão de trabalho" CENA-std, serem muito próximos ao padrão internacional PDB.

Necessita-se agora converter os dados isotópicos obtidos, das equações (36) e (38), para $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ respectivamente, em relação ao padrão internacional PDB.

Inicialmente admite-se a equação:

$$\frac{R(x)}{R(\text{PDB})} = \frac{R(x)}{R(\text{CENA})'} \cdot \frac{R(\text{CENA})}{R(\text{PDB})} \cdot \frac{R(\text{CENA})'}{R(\text{CENA})} \dots \dots \dots (39)$$

ou,

$$\begin{aligned} (\delta_{\text{PDB}}^{(x)} \cdot 10^{-3} + 1) &= (\delta_{\text{CENA}'}^{(x)} \cdot 10^{-3} + 1) \cdot (\delta_{\text{PDB}}^{(\text{CENA})} \cdot 10^{-3} + 1) \cdot \\ &\cdot (\delta_{\text{CENA}}^{(\text{CENA})'} \cdot 10^{-3} + 1) \end{aligned}$$

Desenvolvendo-a obtém-se:

$$\delta_{PDB}^{(x)} = \delta_{CENA}^{(x)} \left[(1 + \delta_{CENA}^{(CENA)'} \cdot 10^{-3}) \cdot (1 + \delta_{PDB}^{(CENA)} \cdot 10^{-3}) \right] + \delta_{PDB}^{(CENA)} (1 + \delta_{CENA}^{(CENA)'} \cdot 10^{-3}) + \delta_{CENA}^{(CENA)'} \dots \quad (40)$$

Na equação (39), teoricamente a razão $\frac{R^{(CENA)'}}{R^{(CENA)}}$ deve ser igual a um, ou que, na equação (40) $\delta_{CENA}^{(CENA)'}$ seja igual a zero. Entretanto, devido à instabilidade da máquina e erros de preparo do "padrão de trabalho" CENA-std, tal razão é diferente de um, e conseqüentemente, o $\delta_{CENA}^{(CENA)'}$ é diferente de zero.

Na equação (40), identifica-se para a análise do carbono que:

$$\delta_{PDB}^{(x)} = \delta_{PDB}^{(x)} \frac{^{13}C}{^{12}C} \dots \quad (41)$$

$$\delta_{CENA}^{(x)'} = \delta_{CENA}^{(x)} \frac{^{13}C}{^{12}C} = 1,0674 \delta_m - 0,0337 \delta^{18}O \dots \quad (42)$$

$$\delta_{CENA}^{(CENA)'} = (- \delta e_c) \dots \quad (43)$$

$$\delta_{PDB}^{(CENA)} = \delta_{PDB}^{(CENA)} \frac{^{13}C}{^{12}C} = +1,90 \dots \quad (44)$$

x = subscrito referente à amostra (45)

Substituindo (41), (43) e (44) na equação (40) e simplificando-a, tem-se que:

$$\delta_{\text{PDB}}^{(x)13\text{C}/12\text{C}} = \delta_{\text{CENA}}^{(x)13\text{C}} \left[1,0019 + 0,00100 (-\delta e_c) \right] + 1,90 + 1,0019 (-\delta e_c) \dots \dots \dots (46)$$

Substituindo (42) na equação (46), chega-se à equação (47).

$$\delta_{\text{PDB}}^{0/00(x)13\text{C}/12\text{C}} = +1,90 + 1,0019 (\delta e_c) + 1,0019 \left(1,0674 \delta_m - 0,0337 \delta^{18}\text{O} \right) \dots \dots \dots (47)$$

Significando:

$\delta_{\text{PDB}}^{0/00(x)13\text{C}/12\text{C}}$ = valor em $\delta^{0/00}$ da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao PDB;

δe_c = fator corretivo para o carbono fornecido pela máquina, obtido da análise diária, do "padrão de trabalho" CENA-std, contra o próprio padrão CENA-std;

δ_m = valor em $\delta^{0/00}$ da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fornecido pela máquina, obtido da análise da amostra em relação ao "padrão de trabalho" CENA-std;

δ^{18}_O = valor em ‰/oo da razão $^{18}O/^{16}O$ fornecido pela máquina, obtido da análise da amostra em relação ao "padrão de trabalho" CENA-std.

Na equação (40) identifica-se para a análise do oxigênio que:

$$\delta^{(x)}_{PDB} = \delta^{(x)}_{PDB} \text{ } ^{18}O/^{16}O \dots\dots\dots (48)$$

$$\delta^{(x)}_{CENA'} = \delta^{(x)}_{CENA} \text{ } ^{18}O/^{16}O = 1,0014 \delta_m + 0,009 \delta^{13}C \dots\dots\dots (49)$$

$$\delta^{(CENA)'}_{CENA} = (-\delta e_o) \dots\dots\dots (50)$$

$$\delta^{(CENA)}_{PDB} = \delta^{(CENA)}_{PDB} \text{ } ^{18}O/^{16}O = -1,63 \dots\dots\dots (51)$$

x = subscrito referente à amostra (52)

Substituindo (48), (50) e (51) na equação (40) e simplificando-a, tem-se que:

$$\delta^{oo(x)}_{PDB} \text{ } ^{18}O/^{16}O = \delta^{(x)}_{CENA} \text{ } ^{18}O \left(0,99837 + 0,000998 (-\delta e_o) \right) - 1,63 + 0,99837 (-\delta e_o) \dots\dots\dots (54)$$

Substituindo (49) na equação (54), chega-se a equação (55).

$$\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}/\text{OO}(x)}^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = -1,63 + 0,99837 (-\delta e_{\text{O}}) + 0,99837 \left\{ 1,0014 \delta_{\text{m}}, + \right. \\ \left. + 0,009 \delta^{13}\text{C} \right\} \dots\dots\dots (55)$$

Significando:

$\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}/\text{OO}(x)}^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ = valor em $\delta^{\text{O}}/\text{oo}$ da razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da amostra em relação ao PDB;

δe_{O} = fator corretivo para o oxigênio fornecido pela máquina, obtido da análise diária, do "padrão de trabalho" CENA-std, contra o próprio padrão CENA-std;

δ_{m} = valor em $\delta^{\text{O}}/\text{oo}$ da razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ fornecido pela máquina, obtido da análise da amostra em relação ao "padrão de trabalho" CENA-std;

$\delta^{13}\text{C}$ = valor em $\delta^{\text{O}}/\text{oo}$ da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fornecido pela máquina, obtido da análise da amostra em relação ao "padrão de trabalho" CENA-std.

4.2. Material e Método

4.2.1. Material

4.2.1.1. Área de trabalho

A área de trabalho localiza-se na Amazônia Central, Reserva Florestal Ducke, situada ao norte do município de Manaus, - Figura 11 - distante 26km dessa cidade, pela rodovia Manaus-Itacoatiara (AM-10).

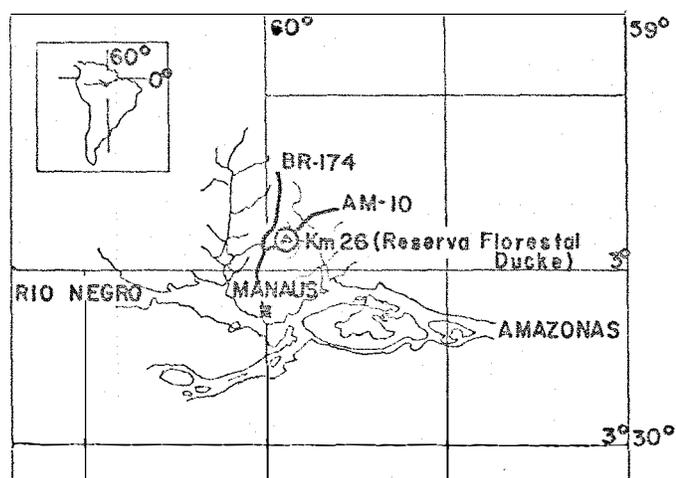


Figura 11 - Área de trabalho: Reserva Florestal Ducke - Amazônia Central

Fonte: BRINKMANN e GÔES RIBEIRO (1972)

A Reserva Florestal Ducke, foi dividida em duas sub-áreas de trabalho: uma referente à mata virgem fechada, "Dentro da Mata", e a outra, a mata virgem com pouca densidade de espécies vegetais naturais, denominada "Fora da Mata".

4.2.1.2. Espécies vegetais

Coletaram-se para diferentes espécies vegetais, -Tabela 7- localizadas "Dentro" e "Fora da Mata" da Reserva Florestal Ducke, "folhas novas" e "folhas velhas" de vários ramos, a diferentes alturas, e a diferentes épocas do ano.

Tabela 7 - Espécies vegetais

Código	Nome vulgar	Nome científico	Família
1	Matamata	<i>Eschweilera matamata</i> , Hub.	Lecythidaceae
2	Breu-Branco	<i>Protium heptaphyllum</i> , March.	Burseraceae
3	Jacareuba	<i>Calophyllum brasiliense</i> , Camb.	Guttiferae
4	Cardeiro	<i>Scleronema micranthum</i> , Ducke.	Bombacaceae
5	Andiroba	<i>Carapa quianensis</i> , Aubl.	Meliaceae

Fonte: SANTOS (1974)^(a)

As folhas das espécies vegetais, foram coletadas de vários ramos retirados das árvores por coleta manual e acondicionadas em sacos plásticos.

(a) Comunicação pessoal. As espécies vegetais foram classificadas pelo De partamento de Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

4.2.1.3. Balões de trabalho

Ampolas de vidro tipo Pyrex - Figura 12a - foram usadas na coleta do dióxido de carbono proveniente da decomposição ácida (ítem 4.2.2.1.2.) do mármore "padrão de trabalho" CENA-std e também na coleta do CO_2 proveniente de cilindro comercial (ítem 4.2.2.2.). A mesma apresenta na parte superior um estrangulamento para facilidade de fechamento por chama de maçarico (ítem 4.2.2.1.2. -e), e na sua parte inferior uma saliência tipo "vírgula", do próprio vidro, com a finalidade de facilitar a quebra da mesma contra o fundo do balão de expansão - Figura 12a - na liberação do CO_2 coletado.

O balão de expansão foi usado como intermediário para admitir o CO_2 existente nas ampolas, no sistema de admissão do espectrômetro de massa (ítem 4.2.1.4.).

O balão de amostra comum - Figura 12c - foi utilizado somente na coleta do dióxido de carbono obtido na combustão da matéria orgânica (ítem 4.2.2.3.). Utilizou-se do balão de reação com dois braços - Figura 12d - na reação ácida do mármore "padrão de trabalho" CENA-std (ítem 4.2.2.1.2.), com o ácido H_3PO_4 (ítem 4.2.2.1.1.), sendo que, no braço principal do referido balão, o mármore CENA-std era introduzido por intermédio de um cartucho de papel manteiga, e no braço inclinado adicionado o ácido H_3PO_4 , com o uso de uma pipeta.

O balão metálico - Figura 12e - foi utilizado na transferência do dióxido de carbono obtido no balão de reação (ítem 4.2.2.1.2.), para as ampolas e também na transferência do CO_2 comercial (ítem 4.2.2.2.)

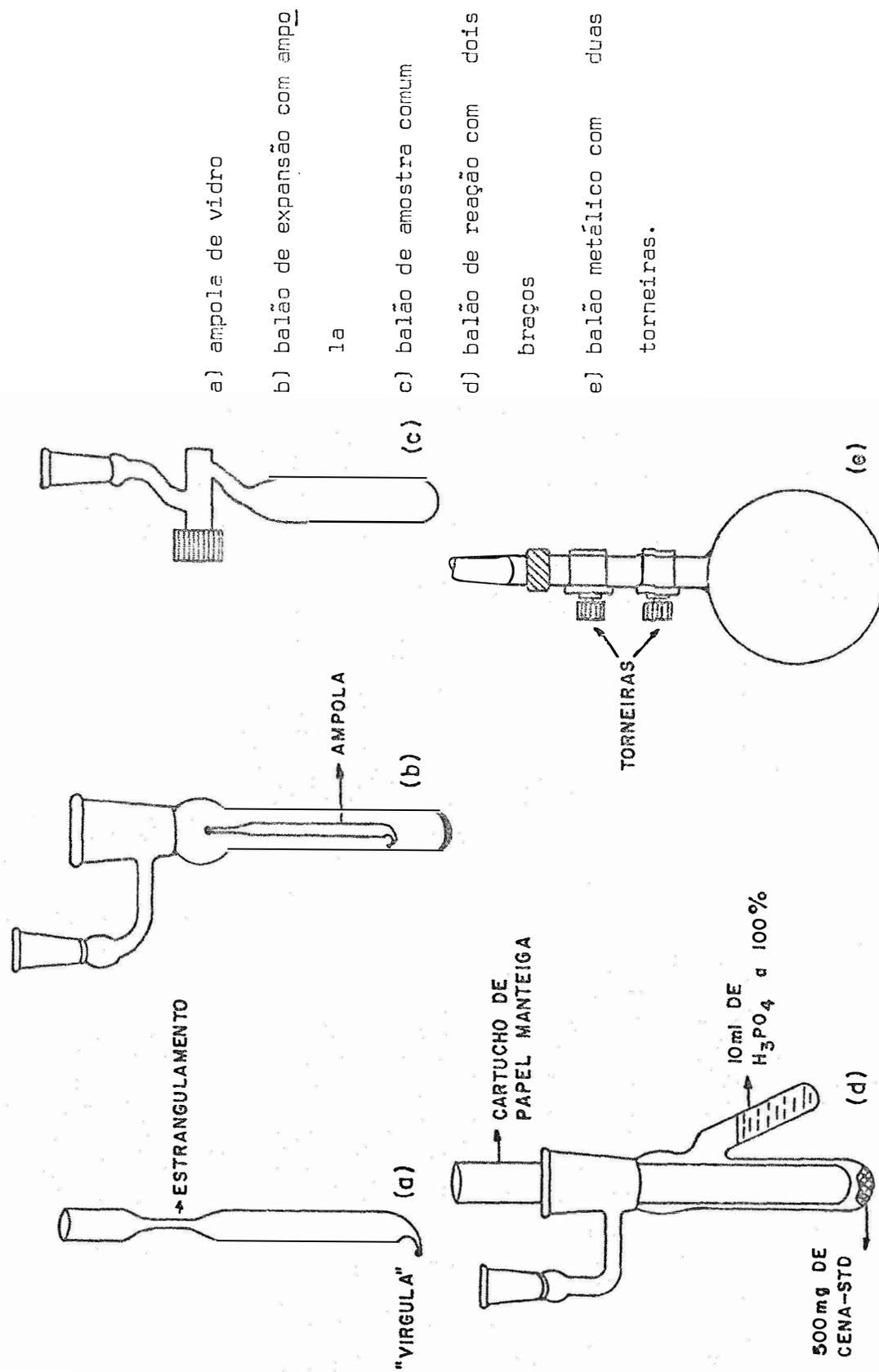


Figura 12 - Balões de trabalho

para posterior distribuição quantitativa em ampolas.

4.2.1.4. Espectrômetro de massa

Foi empregado nas determinações das razões isotópicas naturais $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, do dióxido de carbono, o espectrômetro de massa MAT, modelo 230, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Piracicaba.

4.2.2. Métodos

4.2.2.1. Decomposição ácida do mármore "padrão de trabalho" CENA-std

O preparo do dióxido de carbono "padrão de trabalho" CENA-std pelo método de decomposição ácida com H_3PO_4 a 100%, foi efetuado segundo os critérios usados por *MACCREA (1950)*, *UREY et alii (1951)* e *CRAIG (1953)*.

4.2.2.1.1. Método de preparo do ácido H_3PO_4 a 100%

MACCREA (1950), elegeu o ácido fosfórico como o mais indicado na obtenção do CO_2 a partir da decomposição ácida de carbonato, e segundo *UREY et alii (1951)*, a concentração de 100% era a mais satisfatória na utilização deste ácido. O preparo do H_3PO_4 a 100% obedeceu à seguinte:

- a) Em um "beaker" de 2.000ml coloca-se 750ml do ácido fosfórico comercial a 85%, sob uma chapa de aquecimento a temperatura de 60 - 70^oC.
- b) Adiciona-se, em pequenas quantidades, 500g de pentóxido de fósforo no ácido sob agitação mecânica. Esta adição deve ser efetuada em capela devido ao desprendimento de vapores tóxicos.
- c) Adiciona-se em pequenas quantidades, um excesso de P₂O₅ (~300g) a partir de outro frasco lacrado. Devido ao caráter hidrosfópico do pentóxido de fósforo, considera-se o frasco lacrado contendo 500g.
- d) Todo esse processo inicial de adição do P₂O₅ leva, aproximadamente, o dia todo, durante o qual é alternadamente agitado e aquecido. Observa-se, conseqüentemente, que o ácido está próximo 100%, quando a dissolução do P₂O₅ tornar-se muito difícil, e neste ponto, o volume do ácido no "beaker", estiver em torno de 1.000ml.
- e) Ao término da dissolução do P₂O₅ no ácido, segundo *UREY et alii(1951)*, adiciona-se dois cristais de óxido crômico e três gotas de água oxigenada.
- f) A solução obtida é esfriada à temperatura ambiente e recebida em frasco sob boa vedação. Segundo *MOOK (1968)* a existência da pequena quantidade de água no ácido obtido, não influenciará substancialmente na análise isotópica do dióxido de carbono.

4.2.2.1.2. Método de preparo do CO₂ "padrão de trabalho" CENA-std

O método em si, baseia-se na conversão total do carbono existente no mármore CENA-std, na forma de calcita, a dióxido de carbono, empregando o método de reação ácida à temperatura e tempo controlado segundo *MACCREA (1950)*, *UREY et alii (1951)* e *CRAIG (1953)*e, modificado sob o aspecto da produção de grande quantidade de dióxido de carbono, o qual é inicialmente recebido em um balão metálico - Figura 12e - para posterior distribuição quantitativa em ampolas de vidro - Figura 12a -.

O preparo do dióxido de carbono, "padrão de trabalho" CENA-std foi efetuado sob as seguintes etapas:

- a) Moagem. Inicialmente pequenos pedaços do mármore CENA-std (~10g) são previamente triturados em um recipiente de ferro tipo "pilão". O material obtido é moído subsequente em moinho de grau, para melhor homogeneização, observando, entretanto, o descarte dos primeiros pedaços esfacelados e moídos. O mármore pulverizado é acondicionado em recipiente próprio e guardado em dissecador comum com absorvedor CaCO₃ granulado.
- b) Balão de reação-vácuo. Coloca-se 500mg do mármore pulverizado no braço principal (posição vertical) do balão de reação - Figura 12d - (ítem 4.2.1.3.), por intermédio de um cartucho de papel manteiga e no braço secundário (posição inclinada) do referido balão, coloca-se 10ml do ácido H₃PO₄ a 100% (método de preparo descrito no ítem 4.2.2.1.1.).

Faz-se vácuo no balão de reação com os respectiu

vos reagentes, no sistema esquematizado na Figura 13.

Após os balões de reação, em número de doze estarem acoplados ao sistema por intermédio dos conectores (a) a (l), é efetuado inicialmente um pré-vácuo mecânico em todo o sistema, abrindo a torneira (1) e vagarosamente as torneiras dos balões de reação. Em seguida, faz-se vácuo com a bomba de difusão, fechando a torneira (1) e abrindo as torneiras (2) e (4).

Durante o vácuo nos respectivos balões, observa-se o desprendimento de pequeníssimas bolhas de ar provenientes do ácido e das adsorvidas nas paredes internas do braço inclinado do balão de reação, as quais, desaparecerão após o tempo de uma a duas horas, no qual o vácuo é inferior a $2 \cdot 10^{-3}$ Torr.

Segundo *MACCREA (1950)*, o ácido fosfórico é melhor limpado no sistema à vácuo, devido a sua baixa pressão de vapor. O mesmo autor citou que a presença de pequena quantidade de água presente no ácido concentrado, apresenta uma baixa troca isotópica entre a solução ácida e o dióxido de carbono obtido durante a reação, e que, qualquer efeito de troca isotópica que possa ocorrer é insignificante nos resultados.

- c) Reação a 25°C. Uma vez obtido o vácuo no balão de reação, com os respectivos reagentes, entorna-se o ácido concentrado, existente no braço secundário (inclinado), sobre o mármore moído, presente no braço principal (posição vertical) do referido balão. Subsequente, o balão de reação é levado à banho com água à temperatura de 25°C, por uma ho-

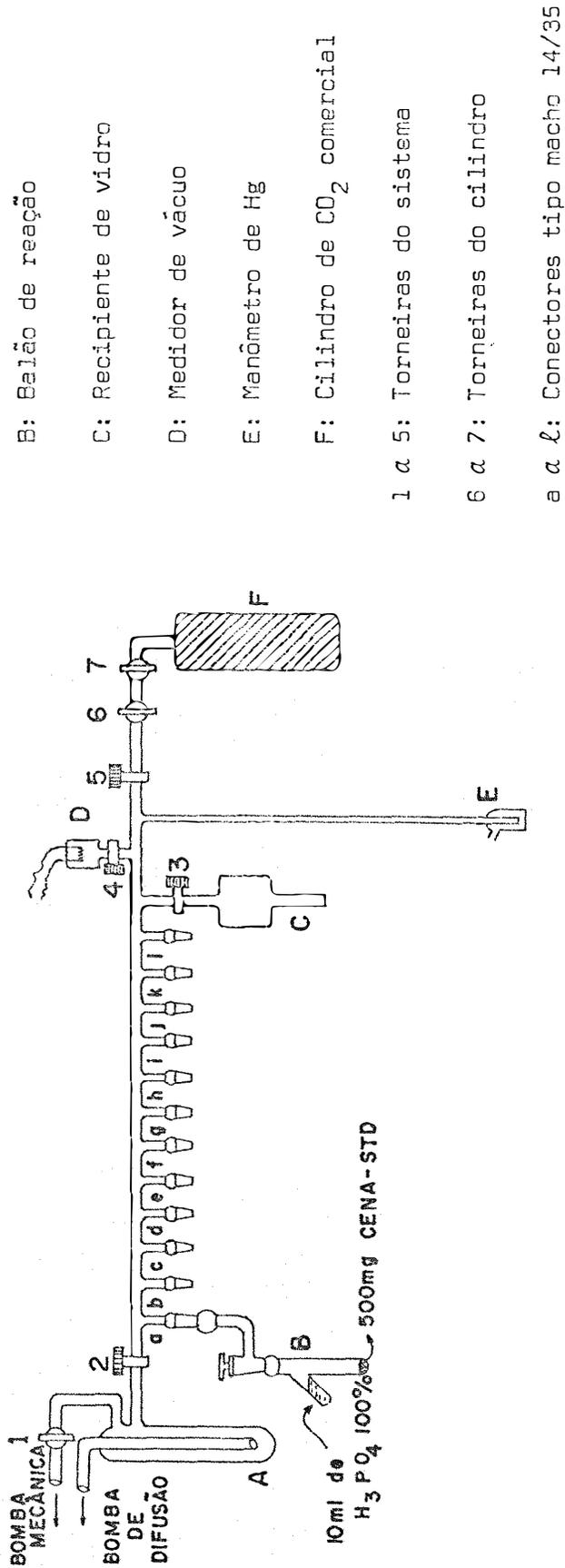


Figura 13 - Sistema de vácuo

ra. Segundo *EPSTEIN et alii (1963)* o dióxido de carbono obtido é proveniente somente da conversão total do carbono existente na forma de calcita, e segundo *MACCREA (1950)* a variação na composição isotópica do dióxido de carbono, sob esta temperatura, é desprezível.

- d) Extração a -190°C . No sistema a vácuo, - Figura 14 - o dióxido de carbono obtido no balão de reação (B), após uma hora, é extraído a -190°C para o balão metálico (G).

Uma vez obtido vácuo em todo o sistema, inclusive no balão metálico, todas as torneiras do sistema são fechadas, menos a torneira (6). Acopla-se o primeiro balão de reação (B), o qual está à temperatura de banho (25°C), na entrada do volume de expansão (C).

O vácuo do sistema é feito na conexão do balão de reação, abrindo primeiramente a torneira (3) e depois a torneira (1). Esfria-se externamente o balão metálico a -190°C e transfere-se o dióxido de carbono CENA-std do balão de reação para o balão metálico, fechando a torneira (3) e abrindo as torneiras (9), (2), (4), (7) e (8).

O dióxido de carbono nessa transferência, sofre limpeza por meio de dois "traps" (E e F), os quais estão a -80°C .

Após a extração do dióxido de carbono do último balão de reação, as torneiras (3) e (4) são fechadas para posterior vácuo no balão metálico, no qual é adicionado externamente mais ou menos quatro cm de nitrogênio líquido acima do nível inicial, e a torneira (5) é aberta para efetuar vácuo sob o dióxido de carbono condensado nas paredes internas do balão metálico.

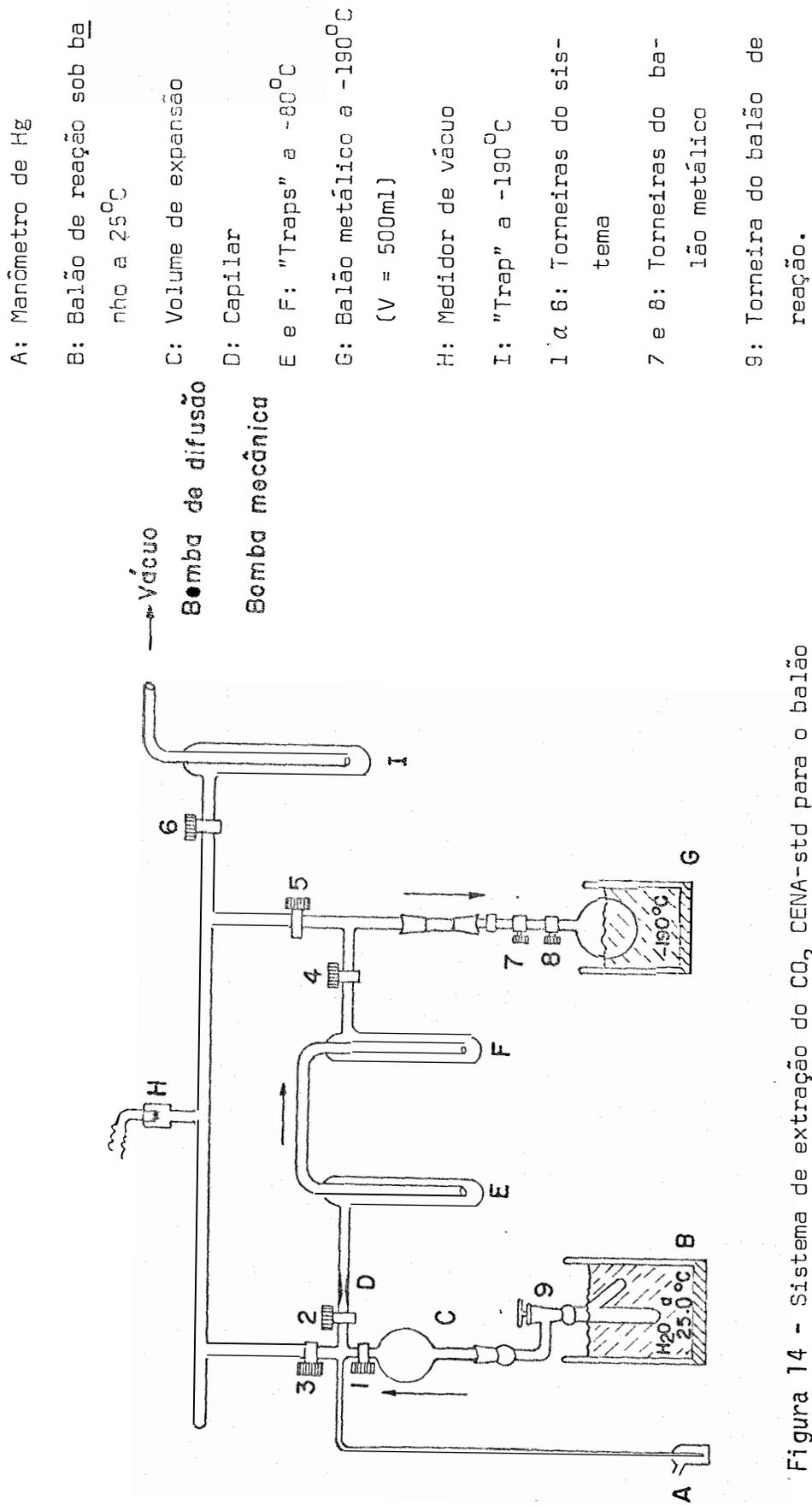


Figura 14 - Sistema de extração do CO₂ CENA-std para o balão metálico a -190°C

Sob estes procedimentos, o dióxido de carbono "padrão de trabalho" CENA-std foi obtido a partir de 3 séries de 12 unidades de balões de reação, obtendo-se um total de 1.000ml . atm.

- e) Transferência-ampolas. No sistema à vácuo - Figura 15 - o volume do dióxido de carbono do balão metálico (G) foi transferido parceladamente para as ampolas (B) a -190°C .

Uma vez obtido vácuo em todo o sistema, inclusive na ampola e até a torneira (8) do balão metálico, todas as demais torneiras do sistema são fechadas, menos as torneiras (5) e (6).

O dióxido de carbono do balão metálico é admitido no volume compreendido entre as torneiras (8) e (7), abrindo e fechando a torneira (8). Expande-se o gás no volume de expansão (C) abrindo a torneira (7), e sua pressão é medida no manômetro de Hg (60mm de Hg) pela abertura da torneira (1).

A transferência do gás para a ampola é feita fechando-se a torneira (5) e abrindo-se as torneiras (3) e (4). Neste caminho o gás sofre limpeza por meio de dois "traps" (E e F), os quais estão à -80°C .

Após a transferência do dióxido de carbono para a ampola, a torneira (4) é fechada. Adiciona-se cerca de dois cm de nitrogênio líquido externamente, acima do halo branco do CO_2 condensado nas paredes internas da ampola, antes de efetuar vácuo na mesma pela abertura da torneira (5).

- A: Manômetro de Hg
- B: Ampola de vidro a -190°C
($V = 3\text{ml}$)
- C: Volume de expansão
- D: Capilar
- E e F: "Traps" a -80°C
- G: Balão metálico
- H: Medidor de vácuo
- I: "Trap" a -190°C
- J: Kajan modelo 316
- K: Chama de maçarico
- 1 a 6: Torneiras do sistema
- 7 e 8: Torneiras do balão metálico.

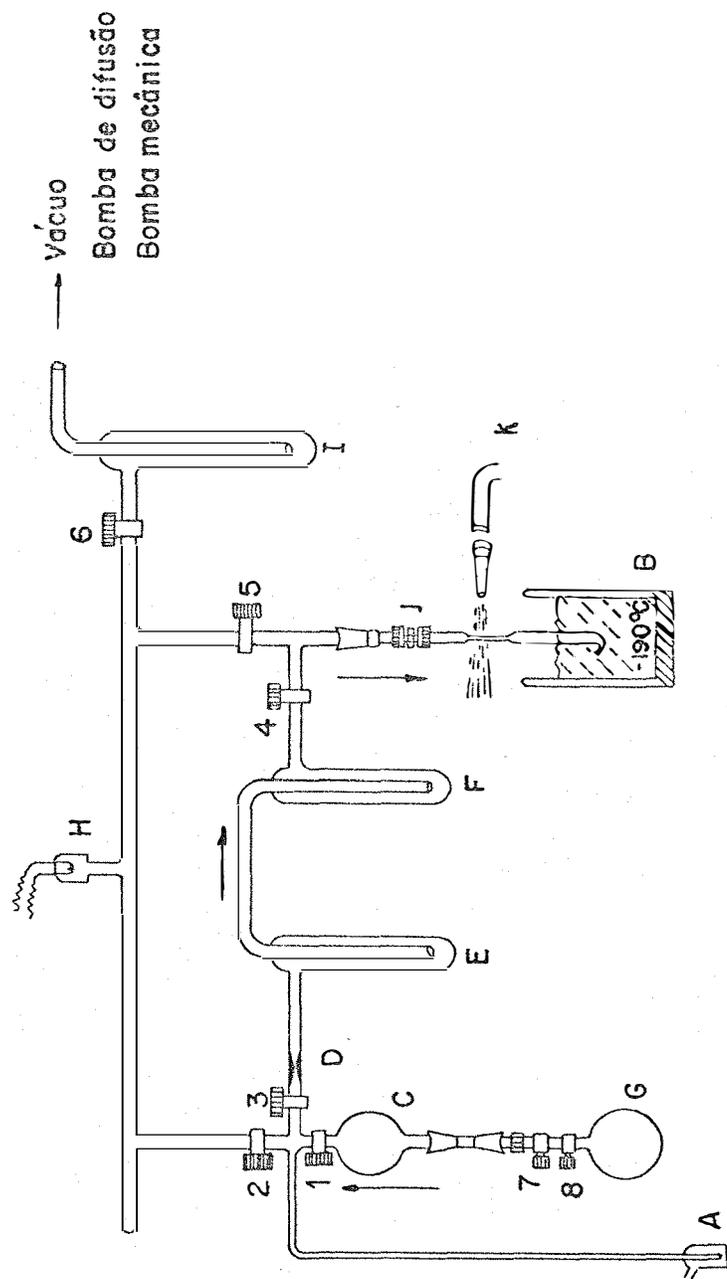


Figura 15 - Sistema de transferência do CO_2 CENA-std para ampolas a -190°C .

Durante este vácuo, a ampola é selada na região do estrangulamento sob chama de maçarico (K).

Segundo *WIESBERG (1974)*, as ampolas manufaturadas sob estas condições podem ser guardadas por tempo indeterminado, sem que ocorra diluição isotópica.

- f) Balão de expansão. Suficiente quantidade de ampolas (~130 unidades) contendo dióxido de carbono "padrão de trabalho" CENA-std, foram manufaturadas, contendo cada uma aproximadamente 7ml. atm., quantidade esta, suficiente para efetuar a análise da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ no espectrômetro de massa.

A ampola é colocada cuidadosamente no interior do balão de expansão - Figura 12b - (item 4.2.1.3.) no qual se faz vácuo, para posterior quebra da ampola contra o fundo do referido balão, liberando-se o dióxido de carbono. O balão de expansão é então levado para o sistema de admissão do espectrômetro de massa, o qual está a -80°C .

- g) Representação esquemática das etapas do método de preparação do CO_2 "padrão de trabalho" CENA-std. A figura 16, fornece uma visualização geral, em representação esquemática, do método de decomposição ácida do mármore "padrão de trabalho" CENA-std, desde a moagem do mármore, até a obtenção do dióxido de carbono CENA-std em ampola.

- a: Moagem em moinho de grau
 b: Balão de reação: 10ml de
 H_3PO_4 a 100% e 500mg de
 CENA-std
 c: Reação sob banho com
 água a 25°C por uma hora
 d: Extração a -190°C
 e: Transferência para ampou-
 la a -190°C
 f: Balão de expansão
 f_1 : Análise no Espectrôme-
 tro de massa. Sistema
 de admissão a -80°C

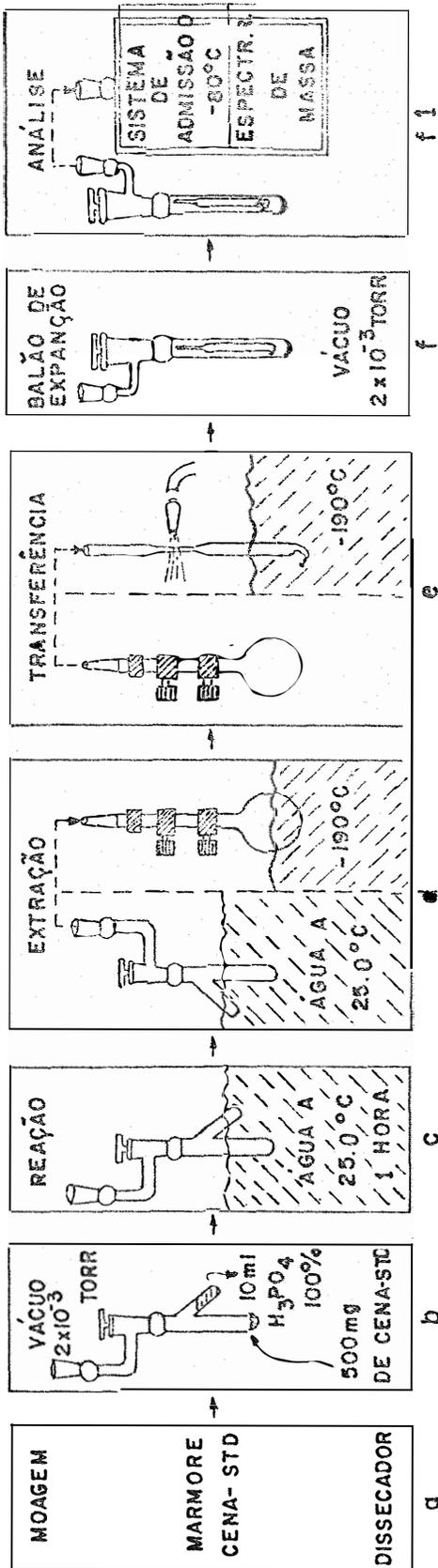


Figura 16 - Representação esquemática das etapas do método de preparo do CO_2 "padrão de trabalho" CENA-std.

4.2.2.2. Método de preparo do dióxido de carbono proveniente de cilindro

O dióxido de carbono comercial foi transferido do cilindro para o balão metálico, empregando como meio de transferência a mesma linha de vácuo da figura 13, descrita no item 4.2.2.1.2.

Neste sistema, o balão metálico, - Figura 12e - foi colocado em uma das entradas (conector L) da referida linha. Após ter sido feito vácuo em todo o sistema, inclusive no balão metálico, aquecido a 70°C com um aquecedor elétrico, o vácuo no conjunto foi inferior a $2 \cdot 10^{-3}$ Torr.

O dióxido de carbono comercial foi assim transferido do cilindro (F) inicialmente para o recipiente (C) a -190°C , através das torneiras (7), (6), (5) e (3). No recipiente (C) o CO_2 a -190°C foi submetido a vácuo do sistema e posteriormente transferido para o balão metálico, obtendo-se um total de 1.000ml atm.

Uma vez recebido o dióxido de carbono comercial no balão metálico, o manufaturamento das ampolas foi feito empregando-se o mesmo processo descrito nos itens 4.2.2.1.2. e, 4.2.2.1.2.-f, de preparo de ampolas de CO_2 "padrão de trabalho" CENA-std.

4.2.2.3. Combustão da matéria orgânica

A obtenção do dióxido de carbono a partir da matéria orgânica é baseado na conversão total do carbono a dióxido de carbono, onde

os compostos orgânicos são queimados sob calor em atmosfera de oxigênio, segundo os critérios usados por *CRAIG (1953)*, *STEYMARK (1961)* e *MOOK (1968)*.

Duas linhas de combustão da matéria orgânica (item 3.3.) foram modificadas e testadas: uma referente a combustão sob fluxo parcial de oxigênio, desenvolvida por *CRAIG (1953)*, e sua modificação descrita no item 4.2.2.3.2.; e a outra, referente a combustão sob fluxo contínuo de oxigênio, desenvolvida por *MOOK (1968)*, e sua modificação descrita no item 4.2.2.3.3.

4.2.2.3.1. Método de preparo da amostra

As folhas coletadas das espécies vegetais (item 4.2.1.2.) foram secas à temperatura de 60°C, em estufa elétrica, por um período de vinte e quatro horas e moídas em moinho elétrico sobre peneira de número 60 "mesh".

Durante a moagem, no intervalo entre uma amostra e outra, o moinho e suas peças são limpas sob jato de ar comprimido. A amostra resultante do lote de folhas foi acondicionada em saco de papel, homogeneizada sob agitação manual e uma pequena quantidade (500g), acondicionada em recipiente próprio de vidro.

Todas as amostras de folhas moídas foram convertidas em dióxido de carbono, através da linha de combustão sob fluxo contínuo de oxigênio, descrito no item 4.2.2.3.3.

4.2.2.3.2. Sistema de combustão sob fluxo parcial de oxigênio

O sistema de combustão sob fluxo parcial de oxigênio - Figura 17 - modificado a partir do sistema proposto por *CRAIG (1953)* (item 3.3.) basicamente consiste em duas etapas de operação:

a) Purificação do oxigênio de cilindro, utilizado durante a combustão.

Uma vez colocado a amostra (10mg) na naveta de porcelana, na parte anterior (torneira 4) do forno de combustão (C) do sistema sob vacuo ($\sim 2 \cdot 10^{-3}$ Torr), o oxigênio de cilindro (A) admitido no sistema (0,5 atm) é "queimado" a 900°C no forno de combustão (C). O oxigênio "impuro" é limpo através dos "traps" (D e G) a -190°C e a circulação do mesmo é efetuada com a bomba Toepler automática (J) por cinco minutos.

O oxigênio "impuro" retido nos dois "traps" (D e G) é retirado para fora do sistema (torneira 14) através de bomba de difusão e bomba mecânica.

b) Combustão a 900°C da amostra

Durante a circulação do oxigênio restante e "limpo" (0,2 atm) no sistema, a naveta é empurrada da parte anterior para o interior do forno de combustão (900°C) com o auxílio da ferrita e imã.

O gás resultante desta combustão é circulado no sistema com o auxílio da Bomba Toepler automática por quinze minutos, limpo no "trap" (D) a -80°C e o dióxido de carbono proveniente da amostra é retido no "trap" (G) a -190°C , para posterior transferência ao balão comum (I) a -190°C .

4.2.2.3.3. Sistema de combustão sob fluxo contínuo de oxigênio

O sistema de combustão sob fluxo contínuo de oxigênio - Figura 18 - modificado por *MATSUI (1977)*^{*} a partir do sistema proposto por *MOOK (1968)*, (item (3.3.)), utiliza reagentes segundo os critérios adotados por *STEYMARK (1961)* e *MOOK (1968)*.

O dióxido de carbono de toda a amostragem (item 5.2.) foi obtido nesse sistema.

Basicamente a combustão da amostra é efetuada em três etapas a saber: a primeira se refere a purificação do oxigênio de cilindro (s) utilizado na combustão, o qual é queimado no forno (b) sob CuO granulado a 900°C. O dióxido de carbono formado é retido no "trap" (c) com solução de KOH.

A segunda refere-se à combustão da amostra propriamente dita, efetuada no interior do forno (d) sob CuO granulado a 900°C.

A última etapa, refere-se a limpeza e retenção dos gases formados durante a combustão, na qual os halogêneos são retidos na Ag metálica (e) a 400°C, o óxido de enxofre oxidado e retido no "trap" (f) com solução de KMnO_4 (60g/l), o vapor de água retido no "trap" (g) a -80°C, e o dióxido de carbono proveniente da combustão da amostra é retido no "trap" (h) a -190°C.

Estas etapas são conduzidas sob fluxo contínuo de oxigênio, à pressão de mais de uma atmosfera, o qual flui vagarosamente por intermédio do estrangulamento (t) e é controlado pela observação visual no fluxô

(*) Comunicação pessoal

metro (a) de água.

Rotina de trabalho: Uma vez efetuado vácuo em todo o sistema ($\sim 2 \cdot 10^{-3}$ Torr) até a torneira (2), o oxigênio de cilindro (s) é admitido no sistema pela abertura da torneira (1). Fecha a torneira (7) isolando o alto-vácuo, abre as torneiras (2), (3), (4) e (6), de modo que o oxigênio limpo circule vagarosamente por todo o sistema e continuamente seja bombeado para fora, por intermédio das torneiras (6), (13) e bomba mecânica.

A amostra moída (10mg), (item 4.2.2.3.1.), é colocada na naveta de quartzo (r), a qual é ligada à ferrita (q) por intermédio de um fio de platina.

Este conjunto (r) e (q) é colocado em posição vertical acima da torneira (10), a qual consiste de um acoplamento cajon, fechado na sua parte superior e acoplado pela parte inferior à extremidade superior do tubo de quartzo, do forno de combustão (d).

Antes da introdução da amostra no interior do forno de combustão (d), coloca-se o "trap" (g) a -80°C , "trap" (h) a -190°C e fecha-se a torneira (2).

Retira-se a torneira (10) cajon, abaixa-se o conjunto (r) e (q) no interior do forno de combustão (d), por intermédio do movimento manual, sentido vertical descendente, do imã (p), de modo que, somente a naveta com a amostra (r) atinja o interior da câmara do forno de combustão (d). Imediatamente recoloca-se a torneira (10) e efetua-se a abertura da torneira (2).

- a: Fluxômetro com água
 b: Forno com CuO granulado, a 900°C
 c: "Trap" com solução de KOH
 d: Forno de combustão com CuO granulado a 900°C
 e: Forno com Ag metálica a 400°C
 f: "Trap" com solução (60g/l) de $KMnO_4$
 g: "Trap" a -80°C
 h, i, n: "Trap" a -190°C
 j: Balão comum
 k: Entrada do O_2 para bomba mecânica
- l: Entrada para o balão comum
 m: Manômetro de Hg
 o: Medidor de vácuo
 p: Imã
 q: Ferrita
 r: Naveta de quartzo
 s: Cilindro de oxigênio
- t: Estrangulamento
 u: Válvula de segurança
 1 a 10: Torneiras do sistema
 11 a 12: Torneiras do cilindro
- 13: Torneira de quatro posições
 14: Torneira do balão comum.

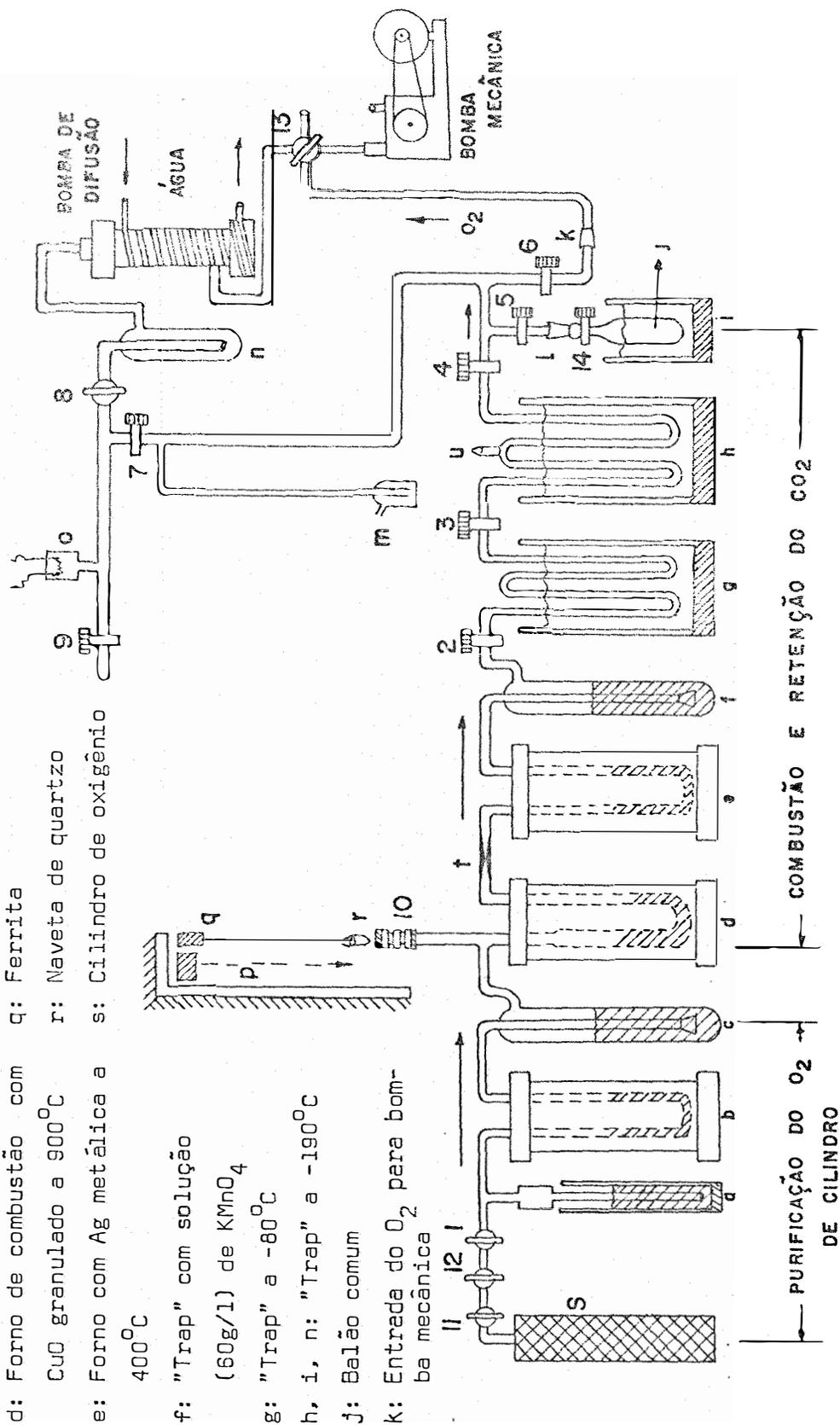


Figura 18 - Sistema modificado de combustão, sob fluxo contínuo de oxigênio

O dióxido de carbono obtido durante a combustão no forno (d) é arrastado pelo fluxo de oxigênio, limpo no "trap" (g) a -80°C e, condensado no "trap" (h) a -190°C . Esta transferência é efetuada durante dois minutos.

Uma vez condensado no "trap" (h), o dióxido de carbono é submetido a vácuo do sistema ($\sim 2 \cdot 10^{-3}$ Torr). Para tal procedimento, fecha-se as torneiras (6) e (3), adiciona-se aproximadamente dois cm de nitrogênio líquido externamente, acima do halo branco do CO_2 condensado nas paredes internas do "trap" (h). Posiciona-se a torneira (13), de modo a conectar a bomba mecânica com a bomba de difusão e abre-se a torneira (7).

A transferência do CO_2 retido no "trap" (h) para o balão de amostra (j) a -190°C , o qual está inicialmente sob vácuo ($\sim 2 \cdot 10^{-3}$ Torr), é efetuada fechando-se a torneira (7) e abrindo-se as torneiras (5) e (14).

Durante a limpeza e transferência desse dióxido de carbono, pode-se efetuar novo preparo de amostra para posterior combustão. Retira-se a torneira (10), levanta-se o conjunto naveta (r) e ferrita (q) por intermédio do movimento manual, sentido vertical ascendente, e deixa-se a naveta esfriar à temperatura ambiente, limpando, se necessário, as cinzas do interior da mesma. Neste interim fecha-se as torneiras (14) e (5) e retira-se o balão (j) com a amostra da entrada (1) do sistema. Coloca-se nova amostra na naveta (r) posicionando-a para nova combustão.

Salienta-se entretanto que os balões de amostra (j) usados no recebimento do CO_2 , foram submetidos à vácuo do sistema ($\sim 2 \cdot 10^{-3}$ Torr) antes de efetuar a primeira combustão.

4.2.2.4. Método de análise relativa da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ com um "padrão de trabalho"

Baseia-se o método, na comparação das intensidades de corrente elétrica, correspondente à razão das massas moleculares ionizadas 45/44 e 46/44 (ítem 4.1.), do dióxido de carbono da amostra, com a corrente, da razão da massa molecular do dióxido de carbono "padrão de trabalho".

Uma vez obtido dióxido de carbono "padrão de trabalho" CENA-std (ítem 4.2.1.2.) e CO_2 proveniente da combustão da amostra (ítem 4.2.2.3.3.), obtêm-se no espectrômetro MAT-230 (ítem 4.2.1.4.), pares de números relativos, correspondentes às razões registradas das massas moleculares, os quais, são transformados em delta per mil da máquina (δ_m) para posterior transformação (ítem 4.1.2.) em valor delta verdadeiro da amostra, relativa ao padrão internacional PDB $\delta_{\text{PDB}}^{(x)\text{o}}/_{\text{oo}}^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $\delta_{\text{PDB}}^{(x)\text{o}}/_{\text{oo}}^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, respectivamente, através das equações (47) e (55). Foi observado inicialmente, a sequência apresentada na Tabela 8, para a rotina diária de análise.

Tabela 8 - Rotina diária de análise relativa da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ com "padrão de trabalho" CENA-std

Espectrômetro MAT-230		$\delta_{\text{CENA-std}}^{0/\text{oo}}$ da máquina = δ_m	
Câmaras de expansão			
Lado A	Lado B	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
CENA-std (balão)	CENA-std (balão)	$\delta_{\text{c}}(1)$	$\delta_{\text{o}}(1)$
CENA-std (ampola)	CENA-std (balão)	$\delta_{\text{c}}(2)$	$\delta_{\text{o}}(2)$
Amostra	CENA-std (balão)	$\delta_m = \delta^{13}\text{C}$	$\delta_m = \delta^{18}\text{O}$
CENA-std (ampola)	CENA-std (balão)	$\delta_{\text{c}}(3)$	$\delta_{\text{o}}(3)$

Na câmara de expansão, Lado B do aparelho, admite-se inicialmente dióxido de carbono "padrão de trabalho" CENA-std, suficiente para a análise diária. No Lado A, o dióxido de carbono a ser analisado é admitido segundo a sequência de ordem da Tabela 8.

As admissões do CO_2 , sofrem limpeza prévia em um "trap" a -80°C na entrada do sistema de admissão do aparelho.

Uma vez analisado para a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, o dióxido de carbono do Lado A, é recolhido para o balão de origem a -190°C , para posterior análise da razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$.

Os valores δe_c e δe_o obtidos, referem-se a fatores corretivos diários (ítem 4.1.2.) fornecidos pelo aparelho, das razões isotópicas do carbono e oxigênio do dióxido de carbono "padrão de trabalho" CENA-std.

O dióxido de carbono obtido pelos métodos de combustão da matéria orgânica, de decomposição ácida de material carbonatado e, de cilindro comercial foi analisado por meio de análise relativa da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ com o "padrão de trabalho" CENA-std.

Na análise da amostra número 147 da amostragem de folhas (ítem 5.2.), efetuada no dia 05/11/76, foram obtidos inicialmente os seguintes resultados em delta per mil (δ_m) da máquina, relativo ao "padrão de trabalho" CENA-std, os quais são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise relativa da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra número 147 com "padrão de trabalho" CENA-std

Espectrômetro MAT-230 Câmaras de expansão		$\delta^{0/00}$ $\delta_{\text{CENA-std}}$ da máquina = δ_m	
Lado A	Lado B	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
CENA-std (balão)	CENA-std (balão)	-0,03	-0,16
CENA-std (ampola)	CENA-std (balão)	+0,07	+0,03
Amostra n° 147	CENA-std (balão)	-31,22	-9,24
CENA-std (ampola)	CENA-std (balão)	+0,04	-0,04
outras amostras	CENA-std (balão)		
CENA-std (ampola)	CENA-std (balão)	-0,06	+0,01

Para a obtenção do valor em $\delta_{\text{PDB}}^{0/00} ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, da amostra número 147, utiliza-se dos seguintes valores isotópicos da Tabela 9.

$$\delta e_c = \frac{(-0,03) + (+0,07) + (+0,04) + (-0,06)}{4}$$

$$\delta e_c = +0,01$$

$$\delta_m = -31,22$$

$$\delta^{18}\text{O} = -9,24$$

Substituindo estes valores na equação (47) obtém-se:

$$\delta_{\text{PDB}}^{0/00(x)} ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = +1,90 + 1,0019 \cdot (-\delta e_c) + 1,0019 \cdot \left[1,0674 \cdot \{\delta_m\} - 0,0337 \cdot (\delta^{18}\text{O}) \right] \dots \dots \dots (47)$$

$$\delta_{\text{PDB}}^{0/00} (\text{n}^{\circ} 147) {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} = +1,90 + 1,0019 (-0,01) + 1,0019 \cdot \left\{ 1,0674 (-31,22) - 0,0337 (-9,24) \right\}$$

$$\delta_{\text{PDB}}^{0/00} (\text{n}^{\circ} 147) {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} = -31,19$$

A obtenção do $\delta_{\text{PDB}}^{0/00(x)} {}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}$, não tem significado na interpretação isotópica, pois segundo *CRAIG (1957)*, a razão ${}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}$ do dióxido de carbono obtido do processo de combustão sob fluxo de oxigênio, refere-se apenas como fator corretivo da razão ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$. Para o dióxido de carbono, proveniente da decomposição ácida de material carbonatado e de cilindro comercial utilizados neste trabalho, o valor em $\delta_{\text{PDB}}^{0/00} {}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}$ é calculado através da equação (55) (ítem 4.1.2.), obedecendo os mesmos critérios de análise da Tabela 9.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados isotópicos das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ das análises isotópicas em relação ao "padrão de trabalho" CENA-std, foram padronizadas em relação ao padrão internacional PDB por meio das equações (47) e (55) respectivamente (ítem 4.1.2.).

Os valores isotópicos do dióxido de carbono obtido através da decomposição ácida dos materiais carbonatados "CENA-std" e "TOILET-SEAT" (ítem 4.2.2.1.), e do CO_2 proveniente de cilindro (ítem 4.2.2.2.), foram calculados em $\delta_{\text{PDB}}^{\text{‰}}$ para as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, ao passo que, para o dióxido de carbono proveniente do processo de combustão de material orgânico sob fluxo de oxigênio (ítem 4.2.2.3.), foram calculados somente valores em $\delta_{\text{PDB}}^{\text{‰}}$ para a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, pois segundo CRAIG (1957), a razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ neste tipo de análise, refere-se apenas como fator corretivo na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

5.1. Relativos à metodologia

5.1.1. Quanto à precisão e repetição do espectrômetro MAT-230

Dióxido de carbono proveniente de cilindro (item 4.2.2.2.), o qual não sofreu nenhum processo de combustão ou reação química, a não ser distribuição quantitativa em ampolas, foi analisado sistematicamente durante vinte e cinco dias e os dados em ‰_{PDB} das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ são apresentados na Tabela 10, obtendo-se um erro analítico total, igual para ambas as razões de $\sigma = \pm 0,02^{\circ}\text{‰}$ da mesma ordem de grandeza do estipulado para o aparelho.

A pequena variação na repetição dos valores isotópicos diários - Tabela 10 - com valor extremo inferior a $\sigma = \pm 0,2^{\circ}\text{‰}$ para as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, possivelmente resultante, isolado ou conjuntamente, do erro sistemático de análise, da linha de preparo da ampola ou mesmo da variação isotópica se existente no cilindro de CO_2 , e inferior ao apresentado por *DUCATTI (1975)*, revelam conjuntamente, a viabilidade do emprego de ampola na análise das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, efetuadas no referido aparelho. Tais suposições serão reforçadas na discussão dos itens 5.1.2. e 5.1.3.

5.1.2. Quanto à precisão e repetição do método de preparo do "padrão de trabalho" CENA-std por decomposição ácida

O dióxido de carbono proveniente da decomposição ácida do mármore "CENA-std" com H_3PO_4 a 100% (item 4.2.2.1.), obtido segundo os

Tabela 10 - Valores isotópicos do CO₂ proveniente de cilindro comercial

Ano 1976	Dia de análise	δ ¹³ C/1000, ‰				δ ¹⁸ O/1000, ‰				$\bar{X} \pm \sigma$ (α)
		1ª	2ª	3ª	4ª	1ª	2ª	3ª	4ª	
	19/10	-27,13	-27,20	-27,18		-23,43	-23,45	-23,48		-23,45 ± 0,01
	20/10	-27,05	-27,26			-23,40	-23,43			-23,42 ± 0,02
	21/10	-27,10				-23,44				-23,44
	22/10	-27,09	-26,99	-27,07		-23,44	-23,47	-23,34		-23,38 ± 0,03
	25/10	-27,29				-23,53	-23,53			-23,53
	26/10	-27,10	-27,27			-23,57	-23,49			-23,53 ± 0,04
	27/10	-27,13	-27,28			-23,72	-23,64			-23,68 ± 0,04
	28/10	-26,73	-27,03			-23,42	-23,66			-23,54 ± 0,12
	29/10	-27,04	-27,12			-23,53	-23,41			-23,47 ± 0,06
	04/11	-27,00	-27,04			-23,57	-23,33			-23,45 ± 0,12
	05/11	-27,15	-27,01	-27,16		-23,26	-23,51	-23,48		-23,42 ± 0,08
	08/11	-26,91	-27,00			-23,54	-23,53			-23,54 ± 0,01
	09/11	-27,19				-23,50				-23,50
	10/11	-27,07	-27,11	-26,97	-27,00	-23,11	-23,37	-23,43	-23,40	-23,33 ± 0,07
	11/11	-27,04	-27,10	-27,19	-27,37	-23,39	-23,40	-23,37	-23,30	-23,33 ± 0,02
	12/11	-27,09	-27,23	-27,01		-23,39	-23,34	-23,26		-23,30 ± 0,02
	16/11	-26,85	-27,20	-26,76		-23,35	-23,36	-23,44		-23,32 ± 0,06
	17/11	-26,81	-26,99	-27,35	-27,52	-23,50	-23,22	-23,52	-23,32	-23,39 ± 0,07
	18/11	-27,06	-27,16			-23,08	-23,40			-23,24 ± 0,16
	19/11	-27,00	-27,19	-27,05		-23,51	-23,35	-23,47		-23,44 ± 0,05
	22/11	-27,19	-27,20			-23,46	-23,26			-23,36 ± 0,10
	23/11	-27,07	-26,68	-26,76		-23,53	-23,91	-23,77		-23,74 ± 0,11
	25/11	-27,01	-27,14	-26,91	-26,90	-23,30	-23,59	-23,41	-23,36	-23,42 ± 0,06
	26/11	-27,31	-27,21	-26,99	-27,11	-23,46	-23,63	-23,41	-23,35	-23,46 ± 0,05
	29/11	-27,21			-27,21	-23,48				-23,48
	$\bar{X} \pm \sigma$ (α)					-27,08 ± 0,02				-23,44 ± 0,02

(α) σ refere-se ao erro médio da média

critérios adotados por *MAcCREA (1950)*, *UREY et alii (1951)* e *CRAIG(1953)*, mas modificado sob o aspecto da produção de uma grande quantidade de CO_2 , para posterior distribuição quantitativa em ampolas (item 4.2.2.1.2.-e), foi analisado sistematicamente durante vinte e cinco dias, e os dados em $\delta_{\text{CENA-std}}^{\circ}/\text{oo}$ para as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ são apresentados na Tabela 11, obtendo-se um erro analítico total, semelhante para ambas as razões de $\sigma = \pm 0,01^{\circ}/\text{oo}$, da mesma ordem de grandeza do estipulado para o aparelho.

As médias dos valores diários em $\delta_{\text{CENA-std}}^{\circ}/\text{oo}$ nas razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ apresentados nesta Tabela 11, são também utilizados como fator corretivo (δe_c) diário da análise do carbono (equação 47) e fator corretivo (δe_o) diário da análise do oxigênio (equação 55) (item 4.1.2.).

A pequena variação na repetição dos valores isotópicos diários obtidos - Tabela 11 - na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de $+0,05 \pm 0,10^{\circ}/\text{oo}$ ($n=29$) à $-0,08 \pm 0,08^{\circ}/\text{oo}$ ($n = 62$); e de $+0,085 \pm 0,015^{\circ}/\text{oo}$ ($n = 33$) à $-0,08 \pm 0,09^{\circ}/\text{oo}$ ($n = 58$) para razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, é indicada pelo teste "t" a nível de significância $\sigma = 0,1\%$ como flutuação isotópica casual, em torno do valor teórico zero.

Observa-se também desta mesma Tabela 11, que o emprego de ampolas, como sugerido por *WIESBERG (1974)*, nos indica mais uma vez que o dióxido de carbono "padrão de trabalho" CENA-std pode ser guardado por um tempo superior a vinte e cinco dias e analisado no MAT-230 para as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, sem que ocorra diluição isotópica com o CO_2 atmosférico, pela simples comparação do valor em $\delta_{\text{CENA-std}}^{\circ}/\text{oo}$ referente à primeira

Tabela 11 - Valores isotópicos do CO₂ proveniente da decomposição ácida do "padrão de trabalho" CENA-std.

Ano 1976	$\delta^{13}C/^{12}C = (\delta_e)_C$					$\delta^{18}O/^{16}O = (\delta_e)_O$					
	Repetições					Repetições					
Dia de análise	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	$\bar{X} \pm \sigma (a)$
19/10	+0,00	+0,01	-0,07	+0,02		-0,10	+0,00	-0,11	-0,02		-0,06 ± 0,03
20/10	-0,10	-0,05				+0,00	-0,11				-0,06 ± 0,06
21/10	-0,06	-0,08				-0,07	-0,06				-0,07 ± 0,01
22/10	-0,01	-0,03	-0,06	-0,07		+0,06	-0,38	-0,21	+0,03		-0,13 ± 0,10
25/10	+0,02	+0,05	-0,11			+0,02	+0,22	-0,13			+0,04 ± 0,10
26/10	+0,01	-0,06	-0,01			-0,10	+0,15	-0,15			-0,03 ± 0,09
27/10	+0,18	-0,08	+0,00			+0,02	+0,06	+0,31			+0,13 ± 0,09
28/10	+0,10	-0,08	-0,21			-0,09	-0,12	+0,02			-0,06 ± 0,04
29/10	-0,07	-0,13	-0,13			-0,05	-0,15	-0,04			-0,08 ± 0,04
04/11	-0,22	-0,04	-0,02			-0,11	-0,11	+0,07			-0,05 ± 0,06
05/11	-0,03	+0,07	+0,04	-0,06		-0,16	+0,03	-0,04	+0,01		-0,04 ± 0,04
08/11	+0,01	-0,27	-0,10			-0,02	-0,02	-0,01			-0,02 ± 0,00
09/11	-0,01	-0,02	+0,06	+0,07		+0,07	-0,11	-0,28	-0,09		-0,10 ± 0,07
10/11	+0,09	-0,08	+0,00	-0,13	-0,02	-0,08	-0,01	-0,09	-0,06	-0,07	-0,07 ± 0,01
11/11	-0,03	+0,02	-0,06	-0,10	-0,11	+0,02	-0,07	+0,07	-0,02	-0,15	-0,03 ± 0,04
12/11	+0,07	-0,02	-0,05	-0,06		-0,08	-0,01	-0,06	-0,01		-0,04 ± 0,02
16/11	-0,14	-0,04	-0,05	-0,10		+0,04	-0,01	-0,11	-0,02		-0,03 ± 0,03
17/11	-0,06	-0,02	-0,15	-0,03	-0,30	+0,01	+0,02	-0,16	-0,10	-0,05	-0,06 ± 0,03
18/11	+0,08	+0,00	-0,07			-0,02	-0,01	-0,01			-0,01 ± 0,00
19/11	+0,03	-0,16	-0,03	+0,06	-0,10	-0,20	-0,06	-0,10	+0,03	+0,11	-0,04 ± 0,05
22/11	+0,10	-0,00	+0,10	+0,10		+0,30	+0,10	+0,20	+0,10		+0,18 ± 0,05
23/11	-0,13	-0,15	-0,16			-0,13	+0,08	+0,28			+0,08 ± 0,11
25/11	-0,06	-0,10	-0,03	+0,01	-0,01	+0,04	-0,05	-0,03	-0,08	+0,12	+0,00 ± 0,04
26/11	+0,01	-0,11	-0,06	+0,00	+0,21	-0,01	-0,04	-0,10	-0,00	+0,00	-0,03 ± 0,02
29/11	-0,00	-0,00				+0,10	+0,10				+0,10 ± 0,03
$\bar{X} \pm \sigma (a)$						-0,04 ± 0,01					-0,02 ± 0,01

(a) σ refere-se ao erro médio da média

com a última ampola analisada. Suposição esta, reforçada pelo fato da variação isotópica diária obtida ser inferior a $\sigma = \pm 0,09^{\circ}/\text{oo}$ para a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e inferior a $\sigma = \pm 0,11^{\circ}/\text{oo}$ para a razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Tais precisões são da mesma ordem de grandeza das obtidas por *MACCREA (1950)*, *CRAIG (1953)* e *MOOK (1968)*.

O dióxido de carbono proveniente da decomposição ácida do "padrão secundário" TOILET-SEAT com H_3PO_4 a 100%, obtido segundo os critérios adotados no preparo do "padrão de trabalho" CENA-std (ítem 4.2.2.1.), foi comparado com diversos laboratórios internacionais e as médias em $\delta_{\text{PDB}}^{\circ}/\text{oo}$ das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ são apresentadas na Tabela 12.

A pequena variabilidade existente entre as médias - Tabela 12 - na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de $+1,87 \pm 0,04^{\circ}/\text{oo}$ ($n = 8$) a $+1,72 \pm 0,09^{\circ}/\text{oo}$ ($n = 3$), e na razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de $-2,23 \pm 0,08^{\circ}/\text{oo}$ ($n = 8$) a $-2,18 \pm 0,11^{\circ}/\text{oo}$ ($n = 3$) é indicado pelo teste "t" a nível de significância $\alpha = 0,1\%$ como variação isotópica casual, ou seja, o teste de "STUDENT" nos mostra e sugere a não ocorrência de uma diferença substancial isotópica, entre o método da decomposição ácida empregado neste trabalho (ítem 4.2.2.1.), com os métodos semelhantes utilizados nestes diversos laboratórios. Tais suposições, são reforçadas pelo fato da diferença absoluta entre as médias da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dos diversos laboratórios, com a média do método empregado neste trabalho, ser da ordem de $0,15^{\circ}/\text{oo}$, e $0,05^{\circ}/\text{oo}$ entre as médias da razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$.

Tabela 12 - Diferença absoluta do "padrão secundário" TOILET-SEAT^(a)

Laboratórios ^(b)	$\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}} / \text{OO}13_{\text{C}} / 12_{\text{C}}$	$\delta_{\text{PDB}}^{\text{O}} / \text{OO}18_{\text{O}} / 16_{\text{O}}$
University of Alberta Department of Geology Edmonton, Canada	+2,05	-2,16
Bundesanstalt für Boden forschung Hannover, B.R.D.	+1,80	-1,90
Zweits Physikalisches Institut der Universität Heidelberg Heidelberg, B.R.D.	+1,86	-2,56
Institut für Stabile Isotope Leipzig, D.D.R.	+1,91	-2,06
Laboratório di Geologia Nucleare Pisa, Italy	+1,79	-2,18
Natuur Kunding Laboratorium der Rijks Universiteit Groningem, The Netherlands	+1,92	-2,51
U.S. Geological Survey Denver Colorado - U.S.A.	+1,64	-2,20
Atlantic Oceanographic Laboratory, U.S.A.	+1,96	-2,24
$\bar{X} \pm \sigma$ ^(c)	+1,87 ± 0,04	-2,23 ± 0,08
Centro de Energia Nuclear na Agricul- tura - ESALQ/USP - Piracicaba-Brasil	+1,72 ± 0,09	-2,18 ± 0,11
Diferença absoluta	0,15 ^O /OO	0,05 ^O /OO

(a) rocha carbonatada utilizada como "padrão secundário"

(b) comunicação pessoal - E. SALATI (1976)

(c) σ refere-se ao erro médio da média.

As observações extraídas das Tabelas 11 e 12 sugerem conjuntamente, que o método global em si da decomposição ácida, na obtenção do CO_2 de material carbonatado com H_3PO_4 a 100% (item 4.2.2.1. e Figura 16), e análise das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ efetuadas no MAT-230, não influenciam de maneira significativa na precisão e repetição do método de preparo do "padrão de trabalho" CENA-std, ou seja, que a flutuação isotópica existente é possível ser devido mais, a fatores casuais do que sistemáticos, uma vez que, segundo *CRAIG (1953)*, o critério usado é baseado na conversão total do carbono presente, a dióxido de carbono. Sob este conceito de trabalho e em ritmo normal de rotina, as variações na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em material carbonatado utilizando do método proposto neste trabalho, podem ser determinadas com precisão da ordem de $\sigma = \pm 0,10^0/00$ ($n = 3$), e $\sigma = \pm 0,11^0/00$ ($n = 3$) para a razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, precisões estas, da mesma ordem de grandeza das obtidas por *MACCREA (1950)*, *CRAIG (1953)* e *MOOK (1968)*.

5.1.3. Quanto à precisão e repetição do método de preparo da amostra por combustão

O dióxido de carbono proveniente da amostra (Mata-Mata) foi obtido segundo os critérios utilizados por *CRAIG (1953)*, *STEYMARK (1961)* e *MOOK (1968)*, em dois sistemas distintos de combustão, modificados. Um, referente ao sistema de combustão sob fluxo parcial de oxigênio - "Linha Craig" (1953) modificado (item 4.2.2.3.2.) e o outro, ao sistema de combustão sob fluxo contínuo de oxigênio - "Linha Mook" (1968) modificado (item 4.2.2.3.3.), sendo que os dados isotópicos em $\delta_{\text{PDB}}^0/00^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ são apresenta-

dos na Tabela 13.

Tabela 13 - Precisão e repetição dos sistemas de combustão

Linhas de combustão modificadas		
Amostra Mata-Mata	Fluxo contínuo de oxigênio - <i>MOOK (1968)</i>	Fluxo parcial de oxigênio - <i>CRAIG (1953)</i>
Repetições	$\delta_{\text{PDB}}^{13\text{C}/12\text{C}}$	$\delta_{\text{PDB}}^{13\text{C}/12\text{C}}$
1º	-34,75	-34,31
2º	-34,87	-34,19
3º	-34,81	-34,48
4º	-34,65	-34,06
5º	-34,66	-34,40
6º	-34,52	-34,86
7º	-34,95	-34,64
$\bar{X} \pm \sigma^{(a)}$	$-34,74 \pm 0,06$	$-34,42 \pm 0,10$
Tempo total de preparo	uma hora	sete horas

(a) σ refere-se ao erro médio da média.

A pequena variabilidade isotópica entre as médias - Tabela 13 - na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de $-34,74 \pm 0,06^{\circ}/\text{oo}$ ($n = 7$) a $-34,42 \pm 0,10^{\circ}/\text{oo}$ ($n = 7$) é indicada pelo teste "t", a nível de significância $\alpha = 0,1\%$, como variação isotópica casual, ou seja, o teste "STUDENT" nos mostra e sugere a não ocorrência de uma diferença isotópica substancial entre as linhas de combustão em pauta. Essa suposição é reforçada pelo fato do er-

ro analítico total $\sigma = \pm 0,10^0/oo$, ser da mesma ordem de grandeza para ambas, e das obtidas por *CRAIG (1953)* e *MOOK (1968)*.

Deve-se também observar da Tabela 13, que o tempo total da rotina de trabalho dispendido na obtenção do dióxido de carbono na "Linha Mook" (~10 minutos/repetição) é inferior ao tempo utilizado na "Linha Craig" (~60 minutos/repetição), devido à simplicidade do sistema e a facilidade de operação da referida linha.

O dióxido de carbono proveniente da amostra "carvão vegetal", obtido na "Linha Mook" foi analisado, sistematicamente, durante vinte e cinco dias e os dados em $\delta_{PDB}^{0/oo} {}^{13}C/{}^{12}C$ são apresentados na Tabela 14, obtendo-se um erro analítico total $\sigma = \pm 0,04^0/oo$, da mesma ordem de grandeza do estipulado para o aparelho.

Esta mesma amostra ("carvão vegetal") foi analisada na linha de combustão original, desenvolvida por *MOOK (1968)*. As médias dos valores isotópicos em $\delta_{PDB}^{0/oo} {}^{13}C/{}^{12}C$ são apresentadas comparativamente na Tabela 15.

A pequena variabilidade isotópica entre as linhas - Tabela 15 - de $-26,37 \pm 0,05^0/oo$ a $-26,50 \pm 0,04^0/oo$ ($n = 33$) é indicada pelo teste "t", a nível de significância $\alpha = 0,1\%$ como flutuação isotópica casual, ou seja, o teste "STUDENT" nos mostra e sugere a não ocorrência de uma diferença isotópica substancial entre as linhas, modificada e a original, suposição esta, reforçada pelo fato da diferença absoluta entre as médias das razões ${}^{13}C/{}^{12}C$ ser da ordem de $0,13^0/oo$, e que o erro analítico total ($\sigma = \pm 0,04^0/oo$) é da mesma ordem de grandeza ($\sigma = \pm 0,05^0/oo$) do

Tabela 14 - Precisão e repetição do sistema de combustão sob fluxo contínuo de oxigênio - "Linha Mook" (1968)

Ano 1976	Amostra "Carvão vegetal" (a)		$\delta_{PDB}^{13C/12C} \pm \sigma$ (b)
	Repetições		
Dia de Análise	1ª	2ª	
19/10	-26,28		-26,28
20/10	-26,47	-26,56	-26,52 ± 0,05
21/10	-26,48		-26,48
22/10	-26,58	-26,74	-26,66 ± 0,08
25/10	-26,30		-26,30
26/10	-26,77	-26,47	-26,62 ± 0,15
27/10	-26,74		-26,74
28/10	-26,03		-26,03
29/10	-26,19		-26,19
04/11	-26,62		-26,62
05/11	-26,57	-26,57	-26,57 ± 0,00
08/11	-26,47		-26,47
09/11	-26,46		-26,46
10/11	-26,81	-26,50	-26,66 ± 0,16
11/11	-26,51	-26,43	-26,47 ± 0,04
12/11	-26,76		-26,76
16/11	-26,30		-26,30
17/11	-26,74		-26,74
18/11			
19/11	-26,47	-26,48	-26,48 ± 0,01
22/11	-26,74		-26,74
23/11	-26,79		-26,79
25/11	-26,44	-26,13	-26,29 ± 0,16
26/11	-26,35	-26,59	-26,47 ± 0,12
29/11			
$\bar{X} \pm \sigma$ (b)			-26,50 ± 0,04

(a) procedente da região de Piracicaba

(b) σ refere-se ao erro médio da média.

obtido por MOOK (1976).

As observações extraídas das Tabelas 13, 14 e 15, sugerem, conjuntamente, que o método de combustão da amostra sob o fluxo contínuo de oxigênio - "Linha Mook" (1968) modificada (ítem 4.2.2.3.3.), e a análise efetuada no MAT-230, não influenciam de maneira significativa na precisão e repetição do método de preparo da amostra e análise da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em matéria orgânica, pois segundo CRAIG (1953), o critério usado, é baseado na conversão total do carbono presente, à dióxido de carbono.

Tabela 15 - Diferença absoluta da amostra "carvão vegetal"

Linhas de combustão sob fluxo contínuo de oxigênio	
Laboratórios	$\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \pm \sigma^{(d)}$
Natuur Kunding Laboratorium der Rijks Universiteit Groningem, The Netherlands ^(a)	-26,37 ± 0,05
Centro de Energia Nuclear na Agricultura, ESALQ-USP, Piracicaba-SP-Brasil ^(b)	-26,50 ± 0,04 ^(c)
Diferença absoluta	0,13 ^o /oo

(a) Linha de combustão original (comunicação pessoal) W.G. MOOK (1976)

(b) Linha de combustão modificada (ítem 4.2.2.3.3.)

(c) Tabela 14

(d) σ refere-se ao erro médio da média

Salienta-se, entretanto, que em rotina normal de preparo e análise da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostragem em si (ítem 5.2.) faz-se necessário um mínimo de três repetições de uma mesma amostra, uma vez que o maior erro analítico observado - Tabela 16 - é da ordem de $\sigma = \pm 0,18^0/00$ na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, possivelmente devido à não homogeneidade isotópica na amostra em questão, precisão essa, entretanto, da mesma ordem de grandeza das obtidas por *CRAIG (1953)*, *PARK e EPSTEIN (1960)*, *SMITH e EPSTEIN (1971)*, *WIESEBERG (1974)* e *PARDUE et alii (1976)*.

5.2. Relativo à amostragem

As folhas das espécies vegetais coletadas (ítem 4.2.1.2., e Tabela 7) foram preparadas previamente (ítem 4.2.2.3.1.) para a obtenção do dióxido de carbono, através do método de combustão (ítem 4.2.2.3.3.) sob fluxo contínuo de oxigênio. Os valores isotópicos da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ foram obtidos por meio da equação (47) (ítem 4.1.2.), pelo método de análise isotópica relativa a um "padrão de trabalho" (ítem 4.2.2.4.).

Os dados isotópicos referentes às folhas em $\delta_{\text{PDB}}^0/00 \text{ } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ são apresentadas na Tabela 16, a qual consta de oito colunas de especificações a saber:

coluna 1: refere-se à codificação do nome científico da espécie vegetal - Tabela 7 -.

coluna 2: refere-se, em concordância com a coluna 1, ao nome vulgar - Tabela 7 - da espécie vegetal.

coluna 3: refere-se à "idade" das folhas (aparência visual) coletadas. As

folhas "novas" ou "velhas", se presentes nesta coluna, são caracterizadas por um (*) e dois (**) asteriscos, respectivamente.

coluna 4: refere-se à altura, tomada do chão, em que as folhas foram coletadas. As expressões "litter", "inferior", "médio" e "superior" quando presentes nesta coluna referem-se: às folhas coletadas no chão, abaixo da saia (zero metros); parte mais baixa (~2 a 5 metros); parte intermediária (~8 a 10 metros); e parte mais alta (~15 a 20 metros) da planta respectivamente.

coluna 5: refere-se à época do ano, especificando o mês, quando possível.

coluna 6: refere-se às sub-áreas de trabalho, se "Dentro" (***) ou "Fora" (****) da Reserva Florestal Ducke.

coluna 7: refere-se às repetições analíticas da mesma amostra.

coluna 8: refere-se ao valor isotópico médio em $\delta_{PDB}^{13C/12C} \pm \sigma$.

Reagrupando os dados da Tabela 16 na Tabela 17, e diferenciando os valores em $\delta_{PDB}^{13C/12C}$ de todas as espécies coletadas para as sub-áreas "Dentro" e "Fora" da Reserva Florestal Ducke.

A viabilidade de que a análise da razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ em folhas de espécies vegetais possam ser usadas na identificação do tipo de ciclo fotossintético, paralelamente a outros meios de determinações, tem a sua razão de ser, uma vez que, os limites isotópicos entre as médias dos tipos de ciclos é superior a $\sim 4^0/00$, segundo *TROUGHTON et alii (1974a)*, e o erro analítico total para esse tipo de análise, foi verificado ser inferior a $\sim 0,2^0/00$.

Comparando as médias de cada espécie da Tabela 17 com os

Tabela 16 - Dados da amostragem das folhas coletadas, de espécies vegetais da Reserva Florestal Ducke.

Colunas											
1	2	3		4	5	6		7			8
Código	Nome Vulgar	Folhas		Altura da Coleta	Época do ano	Área de trabalho		Repetições			$\frac{\sigma}{\mu} \times 100$ C/12 C ± σ (a)
		"novas"	"velhas"			"Dentro"	"Fora"	1ª	2ª	3ª	
1	Mato-Mato										
1.1.	"	**		2 metros	1974	***		-34,53	-34,28	-34,05	-34,28 ± 0,13
1.2.	"	**		9 "	"	***		-32,25	-32,30	-32,21	-32,25 ± 0,03
1.3.	"	**		17 "	"	***		-29,82	-29,94	-29,83	-29,82 ± 0,01
1.4.	"	**		"litter"	10/1976	****		-29,85	-28,83	-28,93	-29,89 ± 0,02
1.5.	"	*		"inferior"	"	****		-30,85	-30,99	-30,89	-30,91 ± 0,04
1.6.	"	*		"médio"	"	****		-31,40	-31,47	-31,31	-31,39 ± 0,05
1.7.	"	*		"superior"	"	****		-31,78	-31,67	-31,65	-31,77 ± 0,06
1.8.	"	**		"inferior"	"	****		-31,05	-31,11	-30,88	-31,00 ± 0,05
1.9.	"	**		"médio"	"	****		-28,56	-28,77	-29,00	-28,82 ± 0,07
1.10.	"	**		"superior"	"	****		-31,48	-31,88	-31,46	-31,64 ± 0,17
2	Breu-Breco										
2.1.	"	**		10 metros	1974	***		-34,37	-34,06	-34,23	-34,23 ± 0,08
2.2.	"	**		17 metros	"	***		-33,44	-33,17	-33,07	-33,23 ± 0,11
2.3.	"	**		"litter"	10/1976	****		-30,87	-30,73	-30,61	-30,67 ± 0,04
2.4.	"	*		"inferior"	"	****		-30,88	-30,20	-30,04	-30,30 ± 0,17
2.5.	"	*		"médio"	"	****		-31,36	-30,72	-30,88	-30,89 ± 0,10
2.6.	"	*		"superior"	"	****		-30,80	-30,74	-30,20	-30,51 ± 0,16
2.7.	"	**		"inferior"	"	****		-32,88	-32,04	-32,06	-32,06 ± 0,01
2.8.	"	**		"médio"	"	****		-30,80	-30,67	-30,74	-30,74 ± 0,04
2.9.	"	**		"superior"	"	****		-31,38	-31,11	-31,28	-31,19 ± 0,05
3	Jecareuba										
3.1.	"	**		"litter"	06/1975	****		-30,86	-30,19	-30,13	-30,13 ± 0,04
3.2.	"	**		2 metros	"	****		-31,86	-31,82	-31,85	-31,85 ± 0,02
3.3.	"	**		10 metros	"	****		-30,45	-30,68	-30,24	-30,45 ± 0,12
3.4.	"	**		15 metros	"	****		-30,40	-30,37	-30,28	-30,35 ± 0,04
3.5.	"	**		"litter"	09/1975	***		-29,86	-28,30	-29,59	-29,52 ± 0,12
3.6.	"	**		8 metros	"	***		-30,88	-30,78	-30,73	-30,73 ± 0,03
3.7.	"	**		20 metros	"	***		-29,70	-29,80	-29,80	-29,77 ± 0,03
3.8.	"	**		"litter"	05/1976	****		-31,29	-31,38	-31,39	-31,33 ± 0,06
3.9.	"	*		2 metros	"	****		-30,70	-30,78	-30,75	-30,75 ± 0,02
3.10.	"	**		10 metros	"	****		-31,48	-31,53	-31,22	-31,41 ± 0,10
3.11.	"	*		15 metros	"	****		-31,82	-31,90	-31,63	-31,90 ± 0,01
3.12.	"	*		"litter"	"	***		-30,88	-30,82	-30,60	-30,77 ± 0,09
3.13.	"	*		8 metros	"	***		-28,80	-29,67	-29,67	-29,65 ± 0,02
3.14.	"	*		15 metros	"	***		-30,88	-30,01	-30,15	-30,18 ± 0,11
3.15.	"	*		20 metros	"	***		-29,78	-29,75	-29,91	-29,81 ± 0,05
3.16.	"	**		"litter"	10/1976	***		-30,50	-30,42	-30,46	-30,46 ± 0,02
3.17.	"	*		"inferior"	"	***		-30,80	-30,66	-30,96	-30,63 ± 0,12
3.18.	"	**		"médio"	"	***		-29,98	-29,74	-29,86	-29,86 ± 0,07
3.19.	"	**		"superior"	"	***		-30,90	-30,43	-30,89	-30,74 ± 0,16
3.20.	"	*		"inferior"	"	***		-30,88	-30,57	-30,88	-30,64 ± 0,18
3.21.	"	*		"médio"	"	***		-28,45	-29,63	-29,54	-29,54 ± 0,05
3.22.	"	*		"superior"	"	***		-30,88	-30,97	-31,04	-30,97 ± 0,04
3.23.	"	**		"litter"	"	***		-30,78	-30,36	-30,57	-30,55 ± 0,11
3.24.	"	**		"inferior"	"	***		-32,45	-32,67	-32,82	-32,65 ± 0,11
3.25.	"	**		"médio"	"	***		-30,54	-30,63	-30,85	-30,67 ± 0,09

Continuação da Tabela 16

Colunas											
1	2	3		4	5	6		7			8
Código	Nome Vulgar	Folhas		Altura de Colte	Época do ano	Área de trabalho		Repetições			$\frac{0}{\delta_{FCB}} / \cos 13,12^\circ \pm \sigma(a)$
		"novas"	"velhas"			"Dentro"	"Fora"	1º	2º	3º	
3.26.	Jacareuba		**	"superior"	10/1976	***		-30,27	-30,40	-30,70	-30,45 ± 0,13
3.27.	"	*		"inferior"	"	***		-32,22	-31,95	-32,22	-32,13 ± 0,09
3.28.	"	*		"médio"	"	***		-30,38	-30,27	-30,16	-30,27 ± 0,05
3.29.	"	*		"superior"	"	***		-29,41	-29,64	-29,53	-29,53 ± 0,07
3.30.	"		**	"litter"	"		****	-31,30	-31,68	-31,53	-31,50 ± 0,11
3.31.	"	*		"inferior"	"		****	-31,35	-31,32	-31,38	-31,35 ± 0,02
3.32.	"	*		"médio"	"		****	-29,89	-30,01	-30,13	-29,01 ± 0,07
3.33.	"	*		"superior"	"		****	-28,77	-28,92	-28,76	-28,82 ± 0,05
3.34.	"		**	"inferior"	"		****	-32,77	-32,84	-32,91	-32,84 ± 0,04
3.35.	"		**	"médio"	"		****	-32,87	-32,59	-32,73	-32,73 ± 0,08
3.35.	"		**	"superior"	"		****	-31,68	-31,54	-31,61	-31,61 ± 0,04
4	Cardeiro										
4.1.	"		**	"litter"	08/1975		****	-27,46	-27,42	-27,72	-27,53 ± 0,09
4.2.	"		**	8 metros	"		****	-28,16	-28,10	-28,22	-28,16 ± 0,04
4.3.	"		**	10 metros	"		****	-28,31	-28,03	-28,13	-28,16 ± 0,07
4.4.	"		**	15 metros	"		****	-27,25	-28,98	-27,12	-27,12 ± 0,08
4.5.	"		**	"litter"	09/1975	***		-30,65	-30,79	-30,74	-30,73 ± 0,04
4.6.	"		**	10 metros	"	***		-31,95	-31,78	-31,75	-31,83 ± 0,06
4.7.	"		**	20 metros	"	***		-31,15	-31,03	-31,16	-31,11 ± 0,54
4.8.	"		**	"litter"	05/1976		****	-28,28	-28,48	-28,54	-28,44 ± 0,08
4.9.	"		**	8 metros	"		****	-29,04	-29,67	-28,01	-29,04 ± 0,02
4.10.	"		**	10 metros	"		****	-28,11	-28,23	-28,00	-28,11 ± 0,07
4.11.	"		**	15 metros	"		****	-28,03	-28,25	-28,10	-28,13 ± 0,07
4.12.	"		**	"litter"	10/1976		****	-27,84	-28,07	-27,95	-27,96 ± 0,07
4.13.	"	*		"inferior"	"		****	-27,85	-29,25	-28,48	-28,21 ± 0,17
4.14.	"	*		"médio"	"		****	-28,28	-28,41	-28,71	-28,44 ± 0,15
4.15.	"	*		"superior"	"		****	-28,68	-28,13	-28,11	-28,11 ± 0,01
4.16.	"		**	"inferior"	"		****	-28,32	-28,61	-28,81	-28,66 ± 0,18
4.17.	"		**	"médio"	"		****	-29,19	-29,26	-29,11	-28,19 ± 0,04
4.18.	"		**	"superior"	"		****	-28,06	-28,10	-28,08	-28,08 ± 0,01
4.19.	"		**	"litter"	"	***		-28,80	-28,05	-28,23	-28,09 ± 0,07
4.20.	"	*		"inferior"	"	***		-27,57	-27,38	-27,61	-27,59 ± 0,12
4.21.	"	*		"médio"	"	***		-28,26	-28,20	-28,15	-28,20 ± 0,03
4.22.	"	*		"superior"	"	***		-27,83	-27,67	-27,73	-27,73 ± 0,04
4.23.	"		**	"inferior"	"	***		-27,44	-27,22	-27,54	-27,40 ± 0,10
4.24.	"		**	"médio"	"	***		-28,03	-27,85	-27,94	-27,94 ± 0,05
4.25.	"		**	"superior"	"	***		-27,88	-28,02	-27,94	-27,95 ± 0,04
5	Andiroba										
5.1.	"		**	"litter"	08/1975		****	-29,50	-29,46	-29,09	-29,35 ± 0,13
5.2.	"		**	5 metros	"		****	-31,06	-30,79	-30,93	-30,93 ± 0,08
5.3.	"		**	10 metros	"		****	-28,77	-28,26	-28,35	-28,46 ± 0,16
5.4.	"		**	15 metros	"		****	-29,84	-29,04	-29,03	-29,04 ± 0,00
5.5.	"		**	"litter"	09/1975	***		-32,53	-32,74	-32,32	-32,53 ± 0,12
5.6.	"		**	10 metros	"	***		-33,31	-33,07	-32,97	-33,12 ± 0,10
5.7.	"		**	20 metros	"	***		-31,68	-31,56	-31,42	-31,56 ± 0,08
5.8.	"		**	"litter"	05/1976		****	-29,77	-29,77	-30,26	-29,93 ± 0,15
5.8.	"		**	5 metros	"		****	-31,36	-31,53	-31,19	-31,36 ± 0,10

Continuação da Tabela 16

Colunas												
1	2	3		4	5	6		7			8	
Código	Nome Vulgar	Folhas "novas" "velhas"		Altura de Colete	Época do ano	Área de trabalho "Dentro" "Fora"		Repetições 1ª 2ª 3ª			$\frac{\delta_{col}}{\delta_{PCS}} \pm 12 \sigma \pm \sigma(a)$	
5.10.	Andiroba	**		10 metros	05/1976		****	-30,98	-30,79	-31,04		-30,94 ± 0,08
5.11.	"	**		15 metros	"		****	-28,56	-29,31	-29,23		-29,17 ± 0,10
5.12.	"	**		"litter"	"	***		-31,23	-31,05	-31,17		-31,15 ± 0,05
5.13.	"	**		10 metros	"	***		-33,23	-33,18	-33,42		-33,28 ± 0,07
5.14.	"	**		15 metros	"	***		-33,41	-33,48	-33,38		-33,43 ± 0,03
5.15.	"	**		20 metros	"	***		-31,08	-31,10	-31,12		-31,10 ± 0,01
5.16.	"	**		"litter"	10/1976		****	-30,33	-30,66	-30,50		-30,30 ± 0,13
5.17.	"	**		"inferior"	"		****	-30,26	-30,64	-30,45		-30,45 ± 0,11
5.18.	"	**		"médio"	"		****	-31,25	-31,28	-31,54		-31,35 ± 0,10
5.19.	"	**		"superior"	"		****	-31,81	-31,67	-31,74		-31,74 ± 0,04
5.20.	"	*		"inferior"	"		****	-28,88	-29,05	-29,13		-29,06 ± 0,04
5.21.	"	*		"médio"	"		****	-29,56	-29,52	-29,75		-29,61 ± 0,07
5.22.	"	*		"superior"	"		****	-29,08	-28,93	-29,16		-29,08 ± 0,05
5.23.	"	**		"litter"	"	***		-30,10	-30,60	-30,13		-30,08 ± 0,04
5.24.	"	*		"inferior"	"	***		-30,94	-30,96	-31,07		-31,00 ± 0,04
5.25.	"	*		"médio"	"	***		-30,100	-29,95	-30,04		-30,00 ± 0,03
5.26.	"	*		"superior"	"	***		-28,57	-28,64	-28,65		-28,61 ± 0,02
5.27.	"	**		"inferior"	"	***		-30,36	-30,75	-30,57		-30,57 ± 0,11
5.28.	"	**		"médio"	"	***		-30,07	-30,90	-30,96		-30,89 ± 0,04
5.29.	"	**		"superior"	"	***		-29,25	-29,31	-29,28		-29,29 ± 0,01
5.30.	"	**		"litter"	"	***		-32,85	-32,86	-32,77		-32,77 ± 0,05
5.31.	"	*		"inferior"	"	***		-33,79	-33,14	-33,29		-33,39 ± 0,18
5.32.	"	*		"médio"	"	***		-33,97	-33,16	-32,99		-33,16 ± 0,10
5.33.	"	*		"superior"	"	***		-31,08	-30,83	-30,53		-30,75 ± 0,11
5.34.	"	**		"inferior"	"	***		-33,81	-33,90	-33,63		-33,88 ± 0,03
5.35.	"	**		"médio"	"	***		-33,46	-34,00	-33,73		-33,73 ± 0,18
5.36.	"	**		"superior"	"	***		-31,86	-30,74	-30,53		-30,70 ± 0,08

(a) o refere-se ao erro médio da média.

valores médios da Tabela 2 (ítem 3.1.) apresentados por *TROUGHTON et alii* (1974a), observa-se a forte possibilidade de que todas as plantas analisadas sejam do ciclo fotossintético do tipo "C-3". Esta suposição é reforçada pela hipótese sugerida por *SALATI et alii* (1976) de fracionamento isotópico em plantas do ciclo "C-3", "C-4" e "CAM".

Desta mesma Tabela 17, observa-se possivelmente que, fatores inerentes ao desenvolvimento da planta com o meio em que vivem, se "Dentro" ou "Fora" da Reserva Florestal Ducke, contribuem para o fracionamento isotópico natural do carbono, ou seja, plantas da mesma espécie de diferentes locais, e diversas espécies em um mesmo local, mostram diversidades isotópicas como sugerido por *CRAIG* (1953).

De um modo geral, as espécies que se desenvolvem em locais abertos, "Fora" da Reserva, mostram uma diferença da ordem de $\sim 2^{\circ}$ ‰ mais pesado em ^{13}C , comparativamente às plantas de locais com circulação de ar "restrito", "Dentro" da Reserva Florestal Ducke, concordando parcialmente com a hipótese de *WICKMAN* (1952), onde o fator ambiental é também uma das causas da variação na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em plantas.

Os dados da Tabela 16 foram reagrupados na Tabela 18, diferenciando-se os valores em $\delta_{\text{PDB}}^{\circ} / \text{‰} \text{ } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de todas as espécies coletadas, para folhas "novas" e "velhas" a diferentes alturas, nas sub-áreas "Dentro" e "Fora" da Reserva Florestal Ducke.

Por meio da Tabela 18, poder-se-á verificar de um modo geral, na sub-área "Dentro" da Reserva, que folhas de "idades" distintas, da planta, isto é, folhas "velhas" mostram diferenças na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Tabela 17 - Valores isotópicos em $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$ (a) das folhas das espécies vegetais coletadas nas sub-áreas "Dentro" e "Fora", da Reserva Florestal Duce.

Código	Nome vulgar	Época do ano	"Dentro" da Reserva	"Fora" da Reserva	Diferença absoluta entre as sub-áreas	$\bar{X} \pm \sigma$
1	Mate-Mata	1974	-32,15 ± 0,63	-30,94 ± 0,23		
		10/1976	-32,15 ± 0,63	-30,94 ± 0,23	1,21	-31,55 ± 0,61
2	Breu-Branco	1974	-33,73 ± 0,23	-30,95 ± 0,14		
		10/1976	-33,73 ± 0,23	-30,95 ± 0,14	2,78	-32,34 ± 1,39
3	Jecareuba	08/1975		-30,89 ± 0,25		
		09/1975	-30,25 ± 0,22			
		05/1976	-29,88 ± 0,09	-31,95 ± 0,17		
		10/1976	-30,69 ± 0,15	-31,23 ± 0,35		
	$\bar{X} \pm \sigma$	-30,27 ± 0,23	-31,16 ± 0,14	0,89	-30,72 ± 0,23	
4	Cardeiro	08/1975		-27,81 ± 0,18		
		09/1975	-31,47 ± 0,16			
		05/1976		-26,54 ± 0,18		
		10/1976	-27,80 ± 0,07	-26,45 ± 0,10		
	$\bar{X} \pm \sigma$	-29,64 ± 1,84	-26,27 ± 0,23	1,37	-28,61 ± 0,68	
5	Andiroba	08/1975		-29,47 ± 0,38		
		09/1975	-32,34 ± 0,35			
		05/1976	-32,60 ± 0,38	-30,49 ± 0,34		
		10/1976	-31,33 ± 0,29	-30,21 ± 0,26		
	$\bar{X} \pm \sigma$	-32,09 ± 0,39	-30,06 ± 0,30	2,03	-31,07 ± 0,51	
Todos as espécies		1974		-32,94 ± 0,60		
		08/1975		-29,39 ± 0,89		
		09/1975	-31,32 ± 0,58			
		05/1976	-31,24 ± 1,36	-30,13 ± 0,83		
	$\bar{X} \pm \sigma$	-29,24 ± 1,09	-30,36 ± 0,51	1,66 ± 0,34	-30,50 ± 0,10	

(a) Valores obtidos a partir da Tabela 16.

de $\sim 0,8^{\circ}/\text{oo}$ mais leve em relação à razão das folhas "novas", e $\sim 0,6^{\circ}/\text{oo}$ para as folhas da sub-área "Fora" da Reserva. Tais fatos podem indicar que, o fracionamento isotópico, ou melhor, que a seletividade em ^{12}C ocorre inicialmente durante a entrada do CO_2 para o citoplasma da folha, sob efeito cinético, e posteriormente, através de reações bioquímicas, pois existe também a possibilidade do fracionamento ocorrer através dos processos metabólicos na planta, como sugerido por *CRAIG (1954b)*, *PARK e EPS-TEIN (1960)* e *SALATI et alii (1976)*.

Poder-se-á também verificar da Tabela 18 e Figura 19, na sub-área "Dentro" da Reserva, tanto para as folhas "novas" como "velhas", a provável ocorrência de um "gradiente isotópico" da parte inferior para a superior da planta, na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, total da ordem de $\sim 1,3^{\circ}/\text{oo}$ mais leve em ^{12}C . Essa variação de decréscimo em ^{12}C com a altura, é inferior ao apresentado por *MÜNICK e VOGEL (1959)*. Tal observação entretanto, não é notada nas plantas da sub-área "Fora" da Reserva Florestal Ducke - Figuras 19.1 e 19.2 -.

Possivelmente, um dos fatores do acréscimo de ^{13}C com a altura, nas plantas "Dentro" da Reserva seja devido à variação na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do dióxido de carbono atmosférico "interno", uma vez que, *KEELING (1958)* observou que a concentração molar (ppm) e a razão isotópica do dióxido de carbono, variavam proporcionalmente no ar "interior" de uma floresta, suposição esta, reforçada pelo fato da não observação do "gradiente isotópico" nas plantas localizadas "Fora" da Reserva, na qual, as mesmas estão totalmente envolvidas pelo ar atmosférico.

De um modo geral, através desta pequena amostragem e dos

Tabela 18 - Valores isotópicos em $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}/12$ (a) das folhas "novas" e "velhas" das espécies vegetais coletadas a diferentes alturas, das sub-áreas "Dentro" e "Fora" da Reserva Florestal Ducke.

Altura (m)	"Dentro" da Reserva				"Fora" da Reserva			
	Folhas		Altura (m)	Dif. (b) Fig. abs.	Folhas		Altura (m)	Dif. (b) Fig. abs.
	"novas"	"velhas"			"novas"	"velhas"		
~15 a 20 "superior"	-29,52 ± 0,62	-30,49 ± 0,40	0,97	~15 a 20 "superior"	-29,66 ± 0,66	-30,18 ± 0,55	0,52	
~8 a 10 "médio"	-30,23 ± 0,81	-31,10 ± 0,55	0,87	19,1 "médio"	-30,07 ± 0,51	-30,05 ± 0,47	0,02	
~2 a 5 "inferior"	-30,95 ± 0,97	-31,60 ± 1,05	0,65	~2 a 5 "inferior"	-29,97 ± 0,58	-31,10 ± 0,39	1,13	
"Litter"	-30,46 ± 0,44			"Litter"	-29,88 ± 0,41			

(a) Valores obtidos a partir da Tabela 16

(b) Diferença absoluta

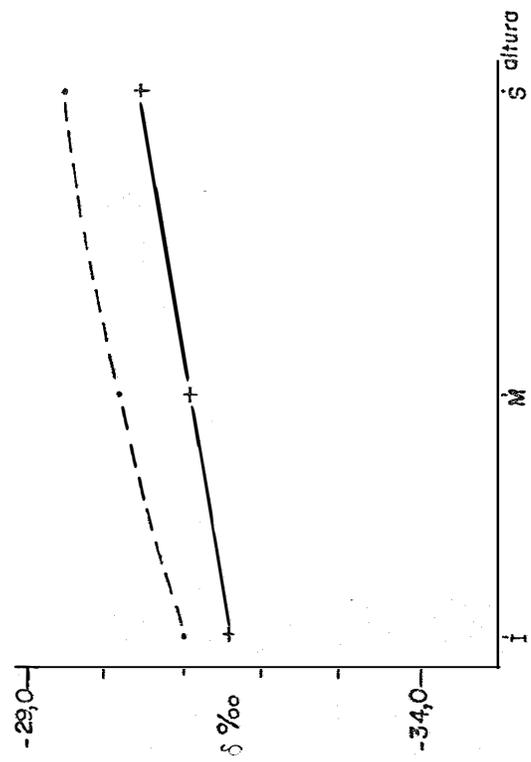
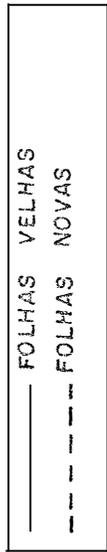


Fig. 19.1. - Todas as espécies "Dentro" da Reserva

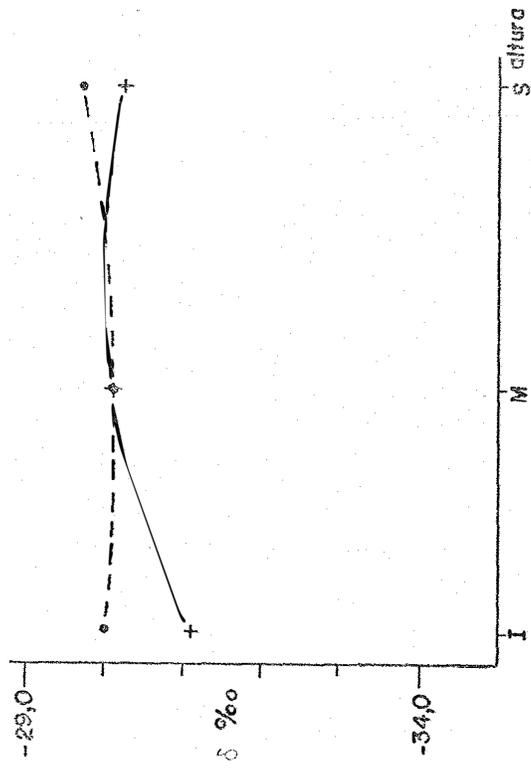


Fig. 19.2. - Todas as espécies "Fora" da Reserva

Figura 19 - $\delta^{13}C/PDB$ versus altitude, de folhas de espécies vegetais coletadas na Reserva Florestal Ducke.

dados obtidos das Tabelas 16, 17 e 18 e Figuras 19.1. e 19.2., poder-se-á supor que a variação da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ nas plantas analisadas, com média de $-30,5 \pm 0,1^{\circ}/\text{oo}$, seja devido, tanto a fatores ambientais, como a processos metabólicos, em concordância com *KEELING (1961b)*, ou seja, que o valor específico na razão isotópica de cada espécie analisada da Reserva Florestal Ducke, mostra uma dependência tanto fisiológica, metabólica e ou ecológica, nas quais elas se desenvolveram.

Entretanto, para se quantificar a intensidade desses fatores, seria necessário um estudo mais detalhado: do mecanismo de reciclagem do dióxido de carbono "interno" com o CO_2 da atmosfera principal, com inter-relações solo-planta-atmosfera, a nível de micro ciclo do carbono; do mecanismo de absorção do dióxido de carbono pela planta, de diversas classes e tipos de ciclos fotossintéticos, a nível de dependência físico-químico; e de uma amostragem mais ampla e sistemática das espécies, a nível de ecossistema.

A título de sugestão, para pesquisas futuras poder-se-á indicar também que:

É possível que grupos de plantas pertencentes a determinadas classes, com ciclos fotossintéticos distintos, possam ser utilizados como "registradores isotópicos" das variações naturais do dióxido de carbono a nível ambiental e ou metabólico, ao lado do estudo do "gradiente i isotópico" do dióxido de carbono da atmosfera "interna" e dióxido de carbono proveniente, parcialmente, da respiração do solo e das plantas. Estes estudos poderiam contribuir para caracterizar, com parâmetros isotópicos e meteorológicos, a difusão do dióxido de carbono da atmosfera principal,

relacionando-o com o micro-clima "interno" em primeiro plano, para uma determinada região ecológica. Quantificações da ordem de $\sim 1^0/00$ dessas variações naturais, poderiam ser obtidas através da análise isotópica relativa da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, e comparadas com os outros parâmetros de ecossistemas semelhantes, distantes em uma grande área vegetal, como por exemplo a Amazônia, no intuito preliminar de estudar o complexo "caminho" percorrido pelo CO_2 atmosférico, e posterior estudo global, do ciclo do dióxido de carbono na biosfera.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos ressaltar as seguintes conclusões:

6.1. Relativas à metodologia

- a) O uso do espectrômetro MAT-230, na determinação das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, com a técnica de análise isotópica relativa de um "padrão de trabalho", permitem a determinação das razões com precisão da ordem do estipulado para o aparelho ($\sigma = \pm 0,02^{\circ}/\text{oo}$). Entretanto, sob rotina de trabalho com três repetições, apresenta valor da ordem de $\sigma = \pm 0,20^{\circ}/\text{oo}$ para ambas as razões.
- b) Ampolas de vidro, podem ser utilizadas no estoque do dióxido de carbono "padrão de trabalho" CENA-std, durante o período de vinte e cinco dias, sem que ocorra diluição isotópica com o ar atmosférico. Entretanto, poder-se-á prever com base nas observações, que o armazenamento seja superior a um mês.

- c) O método de obtenção do dióxido de carbono por decomposição ácida de material carbonatado homogêneo, com H_3PO_4 a 100%, mostrou-se concordante nas determinações das razões $^{13}C/^{12}C$ e $^{18}O/^{16}O$, quando comparado com os métodos semelhantes empregados em laboratórios internacionais, sendo que, o erro analítico total é da ordem de $\sigma = \pm 0,10^0/oo$ e $\sigma = 0,11^0/oo$ para as respectivas razões.
- d) As linhas de combustão da matéria orgânica, sob fluxo contínuo de oxigênio - "Linha Mook" modificada, e sob fluxo parcial de oxigênio - "Linha Craig" modificada, utilizadas na obtenção do dióxido de carbono, apresentam praticamente o mesmo erro analítico total ($\sigma = \pm 0,10^0/oo$) na determinação da razão $^{13}C/^{12}C$. Entretanto, o tempo de trabalho na obtenção do dióxido de carbono de uma amostra dispendido na "Linha Mook", é inferior ao utilizado na "Linha Craig", devido à simplicidade do sistema e facilidade de operação na referida linha.
- e) As linhas de combustão de matéria orgânica sob fluxo contínuo de oxigênio na obtenção do dióxido de carbono, "Linha Mook", original e modificada, apresentam praticamente o mesmo erro analítico total ($\sigma = \pm 0,05^0/oo$) na determinação da razão $^{13}C/^{12}C$. Salienta-se entretanto, que o maior erro analítico total obtido sob rotina de trabalho, na amostragem, foi da ordem de ($\sigma = \pm 0,18^0/oo$) na linha modificada, possivelmente, devido à não homogeneidade do material analisado.

f) De um modo geral, a utilização do método de combustão da matéria orgânica sob fluxo contínuo de oxigênio - "Linha Mook", no preparo de amostra; do método de decomposição ácida de material carbonatado "padrão de trabalho" CENA-std, com H_3PO_4 a 100%; e da técnica de análise isotópica relativa da razão $^{13}C/^{12}C$ do dióxido de carbono com um padrão, permitem o estudo da variação natural de $1^0/00$, com erro analítico total de $\sigma = \pm 0,2^0/00$, sob rotina normal de trabalho.

6.2. Relativas à amostragem

- a) A análise da razão $^{13}C/^{12}C$ de folhas de espécies vegetais, pode ser usada na identificação do tipo de ciclo fotossintético, uma vez que, os intervalos entre as médias das variações naturais de "C-3", "C-4" e "CAM", é superior a $4^0/00$, e o erro analítico total deste tipo de análise, foi inferior a $0,2^0/00$.
- b) As folhas das espécies vegetais coletadas na Reserva Florestal Ducke e analisadas quanto à razão $^{13}C/^{12}C$, indicaram serem essas plantas, pertencentes ao ciclo fotossintético do tipo "C-3".
- c) Folhas de plantas da mesma espécie em diferentes locais, "Dentro" e "Fora" da Reserva Florestal Ducke, apresentam diferenças isotópicas, pois constatou-se que, as espécies de locais abertos mostram-se $\sim 2^0/00$ mais pesados em ^{13}C , comparativamente às plantas de locais com "circulação de ar restrito".

- d) Existe um "gradiente isotópico" crescente em ^{13}C de $\sim 1,3^{\circ}/\text{oo}$, da parte inferior para a superior da planta, tanto para as folhas "novas" como "velhas", das espécies coletadas, "Dentro" da Reserva Florestal Ducke. Essa mesma observação não é notada para as espécies "Fora" da Reserva.
- e) Folhas de "idades" distintas, "novas" e "velhas" de espécies vegetais, da Reserva Florestal Ducke, mostram diferenças isotópicas, pois constatou-se que, as primeiras são $\sim 0,8^{\circ}/\text{oo}$ mais leves em ^{13}C comparativamente às folhas "velhas".
- f) Folhas de espécies diferentes coletadas em um mesmo local, "Dentro" ou "Fora" da Reserva Florestal Ducke, mostram diferenças na razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.
- g) De um modo geral, pode-se afirmar que os valores específicos na razão isotópica, e a média em $\delta_{\text{PDB}}^{\circ}/\text{oo}^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de $-30,5 \pm 0,1$, das folhas das espécies coletadas na Reserva Florestal Ducke, mostram uma dependência de processos metabólicos e de fatores ambientais.

7. SUMMARY

The isotopic ratio analysis for $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ by mass spectrometry using a "working standard" allows the study of ^{13}C natural variation in organic material, with a total analytical error of less than 0,2^o/oo.

Equations were derived in order to determine $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios related to the "working standard" CENA-std and to the international standard PDB.

Isotopes ratios values obtained with samples prepared in two different combustion apparatus were compared; also the values obtained preparing samples by acid decomposition of carbonaceous materials were compared with the values obtained in different international laboratories.

Utilizing the methodology proposed, in this paper several leaves collected at different heights of different vegetals species, found "inside" and "outside" of the Ducke Forest Reserve, located in the Amazon region, are analysed. It is found that the ^{13}C natural variation depends upon metabolic process and environmental factors, both being factors which may be qualified as parcial influences on the CO_2 cycle in the forest.

8. LITERATURA CITADA

BARNARD, G.P., 1953. *Modern mass spectrometry*. London, The Institute of Physics, 326p.

BENDER, M.M., 1968. Mass spectrometric studies of carbon 13 variations in corn and others grasses. *Radiocarbon*, 10 (2): 468-72.

BERRY, J.A. e J.H. TROUGHTON, 1974. Carbon isotope fractionation by C-3 and C-4 plants in "closed" and "open" atmospheres. *In: Carnegie Institution of Washington. Annual report of the director Department of plant biology*. Stanford, California, p. 785-90.

BOATO, G., 1964. *Isotope fractionation process in nature*. Genova, Instituto di Física dell'Università de Genova, 21p. (mimeografado).

BOLIN, B., 1974. O ciclo do carbono. *In: Scientific American ed. A biosfera*. São Paulo, Editora Polígono, cap. 5, p. 51-61.

- BRINKMANN, W.L.F. e M.N. GÓES RIBEIRO, 1972. Air temperatures in Central Amazonia. III - Vertical temperature distribution on a clearcut area and in a secondary forest near Manaus (Cold front conditions July 10th, 1969). *Acta Amazônica*, 2 (3): 25-29.
- BUKOVAC, M.J.; D.N. MOSS e I. ZELITCH, 1975. Carbon input. In: Brown, A.W.A., T. C. Byerly, M. Gibbs e A. San Pietro, eds. Crop productivity-Research Imperatives. East Lansing, Michigan Agricultural Experiment Station, p. 177-200.
- CRAIG, H., 1953. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 3: 53-92.
- CRAIG, H., 1954a. Carbon-13 variations in sequoia rings and the atmosphere. *Science*, 119: 141-142.
- CRAIG, H., 1954b. Carbon-13 in plants and the relationships between carbon-13 and carbon-14 variations in nature. *The Journal of Geology*, 62 (2): 115-48.
- CRAIG, H., 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12: 133-149.
- CRAIG, H. e G. BOATO, 1955. Isotopes. *Annual Review of Physical Chemistry*, 6: 403-432.

- DE GIOVANI, W.F.; E. SALATI; O.J. MARINI e I. FRIEDMAN, 1974. Unusual isotopic composition of carbonates from the Irati formation, Brazil. *Geological Society of America Bulletin*, 85: 41-44.
- DUCATTI, C., 1973. *Noções gerais sobre espectrometria de massa*. Piracicaba, CENA, 16 p. (mimeografada).
- DUCATTI, C., 1975. *Análise isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ no espectrômetro de massa MAT-230*. Piracicaba, CENA, 29 p. (mimeografada).
- EPSTEIN, S.; D.L. GRAF e E.T. DEGENS, 1963. Oxygen isotope studies on the origin of dolomites. In: CRAIG, H.; S.L. MILLER e G.J. WASSERBURG, eds. *Isotopic and Cosmic Chemistry*. La Jolla, California Institute of Technology, p. 169-180. (Contribution no. 1168).
- FRIEDMAN, I.; J.D. GLEASON e K.G. HARDCASTLE, 1970. Water, hydrogen, deuterium, carbon and ^{13}C content of selected lunar material. *Proceedings of the Apollo 11 Lunar Science Conference*, 2: 1103-1109.
- FRIEDMAN, I. e J.R. O'NEIL, 1977. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. M. Fleischer, Editor. In: *Data of Geochemistry* 6ª ed. Washington, United States government printing office. Cap. KK, p. KK₁ - KK₁₂. (Geological Survey professional paper, 440 KK).
- GOODLAND, R.J.A. e H.S. IRWIN, 1975. *A selva amazônica: do inferno verde ao deserto vermelho*. Belo Horizonte, Itatiaia; São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 156 p.

- JENKINS, F.A. e L.S. ORNSTEIN, 1932. On the relative abundance of the carbon isotope, ^{13}C . *Koninkl. Akad. Wetenschap. Amsterdam, Proc. Sect. Science*, 35: 1212.
- KEELING, C.D., 1958. The concentration and isotopic abundances of atmospheric carbon dioxide in rural areas. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 13: 322-334.
- KEELING, C.D., 1961a. The concentration and isotopic abundances of carbon dioxide in rural and marine air. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 24: 277-298.
- KEELING, C.D., 1961b. A mechanism for cyclic enrichment of carbon-12 by terrestrial plants. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 24: 299-313.
- MAcCREA, J.M., 1950. On the isotopic chemistry of carbonates and a paleo temperature scale. *The Journal of Chemical Physics*, 18: 849-857.
- MOOK, W.G., 1968. *Geochemistry of the stable carbon and oxygen isotopes of natural waters in the Netherlands*. Rijksuniversiteit te Groningen, 156 p. (Tese de Doutoramento).
- MÜNNICH, K.O. e J.C. VOGEL, 1959. *Variations in ^{14}C content during the last years*. International ^{14}C Symposium, Groningen, Sept. 1959, 20 p.
- NIER, A.O., 1947. A mass spectrometer for isotope and gas analysis. *The Review of Scientific Instruments*, 18 (6): 398-411.

- NIER, A.O., 1950. A redetermination of the relative abundances of the isotopes of carbon, nitrogen, oxygen, argon and potassium. *Physical Review*, 77 (6): 789-793.
- NIER, A.O. e E.A. GULBRANSEN, 1939. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *Journal Amer. Chem. Soc.*, 61: 697-698.
- PARDUE, J.W.; R.S. SCALAN; C. VAN BAALEN e P.L. PARKER, 1976. Maximum carbon isotope fractionation in photosynthesis by blue-green algae and green algae. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40: 309-312.
- PARK, R. e S. EPSTEIN, 1960. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 21: 110-126.
- PARK, R. e S. EPSTEIN, 1961. Metabolic fractionation of ^{13}C and ^{12}C in plants. *Plant Physiology*, 36 (2): 133-138.
- RANKAMA, K., 1956. Carbon. In: RANKAMA, K. *Isotope Geology*. London, Pergamon Press 2ª ed., cap. 16, p. 181-234.
- RANKAMA, K. e TH. G. SAHAMA, 1968. *Geochemistry*. Chicago, 6ª ed., The University of Chicago, 911 p.
- SALATI, E.; A. DALL'OLIO e E. MATSUI, 1976. *Ecologia Isotópica*. [no prelo].
- SMITH, B.N. e S. EPSTEIN, 1970. Biochemistry of the stable isotope of hydrogen and carbon in Salt Marsh Biota. *Plant Physiol.*, 46: 738-742.

- SMITH, B.N. e S. EPSTEIN, 1971. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiol.*, 47: 380-384.
- STEYMARK, A., 1961. Microdetermination of carbon and hydrogen. In: STEYMARK, A. *Quantitative Organic Microanalysis*. 2ª ed., New York, Academic Press, cap. 9, p. 221-273.
- TEIXEIRA, A.R., 1967. Centros permanentes de pesquisa aplicada para o treinamento de botânicos tropicais na zona neotropical. *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica*. Vol. 4, p. 269-280.
- TROUGHTON, J.H.; K.A. CARD e C.H. HENDY, 1974a. Photosynthetic pathways and carbon isotope discrimination by plants. In: Carnegie Institution of Washington. *Annual report of the director Department of plant biology*. Stanford, California, p. 768-780.
- TROUGHTON, J.H.; J.D. STOUT e T. RAFTER, 1974b. Longterm stability of plant communities. In: Carnegie Institution of Washington. *Annual report of the director Department of plant biology*. Stanford, California, p. 838-845
- UREY, H.C., 1947. The thermodynamic properties of isotopic substances. *J. Chem. Soc.*, 562-581.
- UREY, H.C.; H.A. LOWESTAN; S. EPSTEIN e C.R. MCKINNEY, 1951. Measurement of paleotemperatures and temperatures of the Upper Cretaceous of England,

- Denmark, and the southeastern United States. *Bulletin of the Geological Society of America*, 62: 399-416.
- VAUGHAN, A.L.; J.H. WILLIAMS e J.T. TATE, 1934. Isotopic abundance ratios of C, N, A, Ne and He (Abstract). *Phy. Rev.*, 46: 327.
- WEAST, R.C., ed., 1973. *Handbook of Chemistry and Physics*. 53^a ed., Cleveland, Chemical Rubber, p. B-248.
- WICKMAN, F.E., 1952. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes in plants. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2: 243-254.
- WICKMAN, F.E.; R. BLIX e H. VON UHISCH, 1951. On the variations in the relative abundance of the carbon isotopes in carbonate minerals. *J. Geol.*, 59: 142-147.
- WIESBERG, L., 1974. *Die ¹³C-abnahme in holz von baumjahresringer, eine untersuchung zur antropogenen beeinflussung des CO₂-haushaltes der atmosphäre*. Jülick, Institut of Physical Chemistry, 121 p. (Tese de Doutoramento).