

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”



CENTRO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS - CIE

Trabalho de Conclusão do Curso

Otimização do procedimento de análise isotópica no EA-IRMS, de Carbono e Nitrogênio de forma simultânea e isolada em amostras biológicas

Aluno: *Alexandre Locci Nogueira dos Santos.*

Aluno de Graduação em Física Médica – IBB - UNESP

Orientador: *Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa.*

Docente do Departamento de Física e Biofísica – IBB - UNESP

Botucatu

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”



Centro de Isótopos Estáveis - CIE

Otimização do procedimento de análise isotópica no EA-IRMS, de Carbono e Nitrogênio de forma simultânea e isolada em amostras biológicas

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências
de Botucatu, Física Médica – UNESP,
como parte das exigências para a
graduação em Física Médica.

Aluno: Alexandre L. Nogueira dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa.

**Botucatu
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Locci Nogueira dos Santos, Alexandre.

Otimização do procedimento de análise isotópica no EA-IRMS, de carbono e nitrogênio de forma simultânea e isolada em amostras biológicas / Alexandre Locci Nogueira dos Santos. - Botucatu, 2018

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Vladimir Eliodoro Costa
Capes: 10501002

1. Isótopos estáveis. 2. Espectrometria de massa. 3. Carbono - Isótopos. 4. Nitrogênio - Isótopos. 5. Espécimes biológicos.

Palavras-chave: Bio-elementos; Espectrômetro de massa; Isótopos estáveis; Razão isotópica.

Agradecimentos

Agradeço à Instituição Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, campus de Botucatu, por todas as oportunidades que me proporcionou em termos de aprendizado.

Ao professor Dr. Vladimir Eliodoro Costa pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste TCC.

Agradeço a Deus que sem a vontade dele, nada disso teria acontecido e aos professores por me proporcionarem o conhecimento necessário no processo de formação profissional.

Dedico este trabalho à memória da minha vó Maria Aparecida Corrêa Locci, que infelizmente não pode estar presente nesta etapa, mas independente das intercorrências da vida, onde ela estiver, sei que estará muito feliz pela conquista de seu neto.

Agradeço à toda minha família, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À minha mãe Rita de Cássia Locci Nogueira dos Santos e ao meu pai Marcus Vinicius Nogueira dos Santos que sempre foram meu alicerce, que sempre estavam do meu lado nas horas de desânimo e cansaço e que apesar de todas as dificuldades sempre me fortaleceram e incentivaram a seguir em frente, meu eterno obrigado.

A todos os meus amigos, obrigado por cada momento que vivemos juntos ao longo desses quatro anos.

Um TCC é um grande desafio para um graduando de Física Médica, pois o curso é extremamente denso e complexo. Ao longo desses quatro anos, estudamos, aprendemos, tivemos dificuldades, noites e noites em claro, fizemos muitas coisas, cada momento vivido dentro desta universidade está implicitamente neste trabalho. Portanto me orgulho de cada passo conquistado, cada matéria aprovada, pois se fosse fácil, provavelmente o gosto de concluir não seria tão satisfatório.

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
▪ 2.1.Amostras	13
▪ 2.2.Preparação das amostras	13
▪ 2.3.Pesagem das amostras	14
▪ 2.4.Analise das amostras através do (EA-IRMS)	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	15
4. CONCLUSÃO	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

RESUMO

A análise dos isótopos estáveis através do analisador elementar – espectrômetro de massa por razão isotópica (*EA-IRMS*) é devido a sua capacidade de analisar os bio-elementos (Carbono, Hidrogênio (Deutério), Nitrogênio e Enxofre). Essa ferramenta é de grande importância para a ciência, principalmente se tratando de isótopos de carbono (C) e nitrogênio (N), que são os elementos mais analisados em nosso laboratório, primeiramente devido a sua abundância nos tecidos de animais e vegetais e também pela gama de testes que conseguem ser feitos baseado na análise desses elementos. Com isso, o intuito do presente trabalho foi avaliar os valores isotópicos de C e N em amostras biológicas analisados pelo *EA-IRMS* em três diferentes condições: amostras colocadas no momento que houve a troca da coluna, ou seja no início e amostras colocadas no final da coluna, ou seja, quando está prestes a ser trocada novamente; simultânea ou separada de C e N; e com amostras moídas ou em fragmentos. Dessa forma, analisando todos esses fatores, tentamos mostrar quais tipos de procedimentos devem ser utilizados para que se adequem melhor às diferentes técnicas utilizadas no cotidiano dos laboratórios. Ao fim dos testes, constatamos pequenas variações nos resultados, os valores do $\delta^{13}\text{C}$ tiveram maiores variações, quando comparados com os valores de $\delta^{15}\text{N}$. Não esperávamos essas variações nos resultados, pois as análises foram feitas em um único espécime, tanto o músculo do peixe, quanto a folha de cacau. Porém, vale destacar que este estudo foi apenas uma avaliação inicial das três diferentes condições de análise das amostras, já que não tem muitos estudos relacionados a esses testes. O que constatamos foi que amostras moídas são mais fáceis de manuseá-las durante a pesagem e são mais homogêneas para serem analisadas e que as amostras em pedaços.

Palavras-chave: razão isotópica, espectrômetro de massa, bio-elementos isótopos estáveis.

ABSTRACT

Stable isotope analysis through the elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometer (EA-IRMS) is due to its ability to analyze the bio-elements (carbon, hydrogen (Deuterium), nitrogen and sulfur). This tool is of great importance for science, especially when it comes to isotopes of carbon (C) and nitrogen (N), which are the most analyzed elements in our laboratory, primarily due to its abundance in the tissues of animals and plants and also by the range of tests that can be made based on the analysis of these elements. The aim of this work was to evaluate the isotopic values of C and N in biological samples analyzed by EA-IRMS in three different conditions: samples placed at the time of the column change, is at the beginning and samples placed at the end of the column, that is, when it is about to be changed again; simultaneous or separate from C and N; and with samples ground or in pieces. Thus, analyzing all these factors, we try to show what types of procedures should be used to better fit the different techniques used in the laboratories' daily routine. At the end of the tests, we observed small variations in the results, the values of $\delta^{13}\text{C}$ had greater variations, when compared with the values of $\delta^{15}\text{N}$. We did not expect these variations in the results, since the analyzes were made and a single specimen, both the fish muscle and the cocoa leaf. However, it is worth mentioning that this study was only an initial evaluation of the three different analysis conditions of the samples, since it does not have many studies related to these tests. What we found was that milled samples are easier to handle during weighing and are more homogeneous for analysis and sample in pieces.

Keywords: isotope ratio, mass spectrometer, bio-elements, stable isotope.

1. INTRODUÇÃO

A análise dos isótopos estáveis é uma metodologia utilizada em inúmeras áreas como ciências humanas, biológicas, saúde, agrária, forense, como ferramenta de análise, (FRY, 2006). Em ciências humanas é utilizado para entender como era a alimentação de civilizações da idade média (ROYER et al., 2017), na ciências biológicas é utilizado por exemplo para o estudo de migração de aves, do nível trófico de um animal em seu habitat natural. Na saúde como diagnóstico de algumas doenças gástricas, como presença da *Helicobacter pylori* na mucosa estomacal e esvaziamento gástrico. Nas agrárias é utilizado para saber a localidade de cada vegetal de acordo com a fixação de nitrogênio e carbono e na ciência forense nos casos de tráfico de drogas e adulteração de bebidas e alimentos (BENSON et al., 2006).

Esta análise foi de grande utilidade nas últimas duas décadas, sendo indispensável para aplicações quantitativas e qualitativas, permitindo análise dos bio-elementos (Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio, Oxigênio e Enxofre) (WIESER; BRAND, 1999). Dentre os bio-elementos, o Carbono e o Nitrogênio são os mais analisados em testes que envolvem ciências da vida em geral, pois são isótopos com maior abundância que ficam depositados nos diversos tecidos dos indivíduos (SABATELLI; PEARSON; JASPER, 2017).

Portanto como exemplos de tecidos com abundância em carbono e nitrogênio, temos a animal e a vegetal (MICHENER; LAJTHA, 2007). Com isso, um exemplo de estudo mencionado acima sobre adulteração de alimentos, temos a metodologia da razão isotópica do carbono, que se baseia na mistura de compostos produzidos a partir de plantas dos ciclos fotossintéticos C₃ (laranja, uva, maçã, pêssego, etc.) e C₄ (cana-de-açúcar, milho, sorgo, etc.) (ZANASI et al., 2006). Os vegetais C₃ apresentam valores de enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) entre -22,00 e -4,00 per mil (‰). Nos vegetais C₄, o $\delta^{13}\text{C}$ varia de -9,00 a -16,00‰. Essa diferença entre plantas C₃ e C₄ também é encontrada nos seus produtos e derivados, podendo determinar com precisão a origem botânica do carbono (WIESER; BRAND, 1999).

Há estudos em que se faz necessário somente realizar testes da razão isotópica de forma separada, ou seja, analisando apenas um isótopo, como por exemplo testes realizados com análise de sucos. O isótopo a ser analisado é o carbono; já em estudos de rastreabilidade de carnes, o isótopo analisado é o nitrogênio. Podemos ter experimentos em que se faz necessário testar os dois isótopos como por exemplo amostras animais e vegetais em estudo de ecologia trófica e de ecossistema (ZANASI et al., 2006).

A espectrometria de massa da razão isotópica é um método analítico, empregado para identificar a estrutura química de uma substância, que até então é desconhecida (sem nenhum

conhecimento prévio de sua composição) (WIESER; BRAND, 1999). O funcionamento da espectrometria de massa da razão isotópica (*IRMS*) por fluxo contínuo acoplado a um analisador elementar (*EA*), ocorre da seguinte forma: simultaneamente com a entrada da amostra na coluna de cromatografia de oxidação (combustão) no *EA*, são injetados oxigênio e hélio na respectiva coluna. O oxigênio é responsável por alimentar a combustão e o hélio é somente um gás de arraste. Na coluna a amostra é queimada e com isso é liberado CO_2 , NO_x e outros gases. Em seguida os gases passam para a coluna de redução, onde são reduzidos os NO_x em N_2 e retidos outros gases pertencentes a família dos halogênios, como por exemplo flúor e cloro. Depois, CO_2 e N_2 seguem para outras duas colunas pequenas chamadas de Carbosorb onde é retido o CO_2 caso queira analisar N_2 , ou perclorato de magnésio, se houver água na amostra que ficará retida nesta etapa. Após segue para a coluna de cromatografia gasosa onde ocorre a separação dos gases.

Depois de separados os gases, eles são carregados a partir dos gases de arraste (He) para a interface (*ConFlo IV Universal Interface*). Esta interface é responsável pela diluição dos gases e determinação do gás que entra no *IRMS*. Estes podem ser os gases padrão de CO_2 e N_2 . No *IRMS*, os íons gerados serão acelerados por um campo magnético através de uma trajetória curvilínea. Desta forma, os íons maiores vão percorrer caminhos maiores e íons menores, irão percorrer caminhos menores, até atingirem os receptores pré-determinados na análise. Por fim é gerado um sinal elétrico que será analisado em um *software*. (BRENNAN et al., 1998). O acoplamento do *IRMS* com o *EA* por fluxo contínuo (*CF-IRMS*), é algo recente no mercado e apresenta inúmeras vantagens de fornecer valores isotópicos dos diferentes componentes de uma mistura complexa (MEIER-AUGENSTEIN, 1999). O funcionamento de um *EA-IRMS* é descrito pelas figuras abaixo:

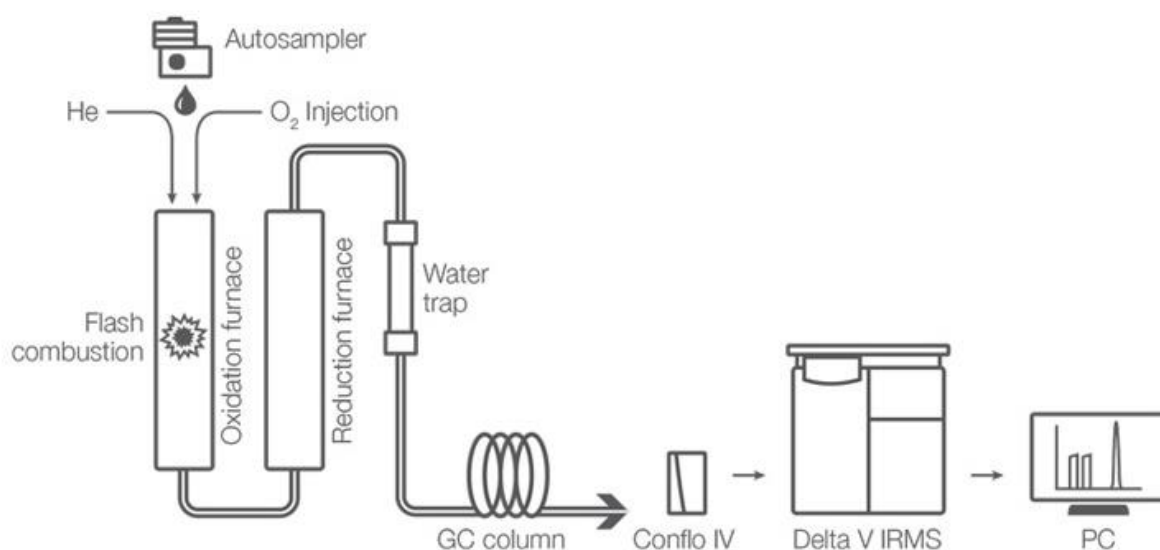


Figura 1. Funcionamento de um *EA-IRMS*.

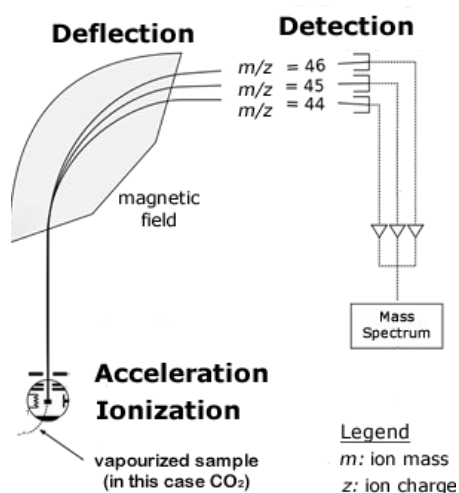


Figura 2. Funcionamento do Delta V IRMS.

As duas colunas de cromatografia são periodicamente trocadas, e, por isso, são consideradas consumíveis (WANG; SESSIONS, 2008). Abaixo está uma figura ilustrando a composição das colunas de oxidação e de redução:

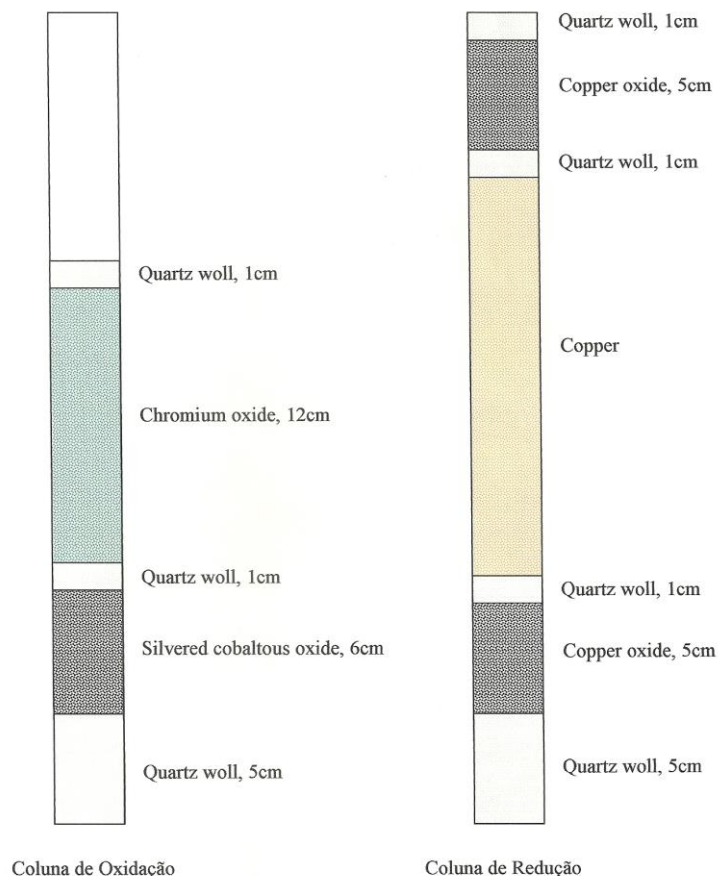


Figura 3. Composição das colunas de oxidação e de redução do *IRMS*.

As análises de C e N podem ser realizadas de forma simultânea ou separada, dependendo do tipo de amostra que o laboratório esteja analisando, de acordo com as informações do fabricante. Se analisarmos os isótopos simultaneamente ou separadamente, os resultados não serão alterados; fica à escolha do operador qual metodologia melhor se adequa ao seu trabalho. De acordo com o fabricante, a confiabilidade dos resultados também se mantém quando tratamos de amostras moídas ou apenas fragmentadas. Podemos colocar no *EA-IRMS* amostras em pedaços ou amostras moídas, esse fator também fica a critério do operador segundo a metodologia que melhor se adequa ao trabalho. Cabe ressaltar que amostras moídas são mais homogêneas que as fragmentadas e mais fáceis de serem pesadas.

Portanto o objetivo do trabalho foi avaliar os valores isotópicos de C e N em amostras de origens animal e vegetal analisados por *EA-IRMS* em três diferentes condições: no início ou final da coluna; análise simultânea ou separada de C e N; e com amostras moídas ou fragmentadas. Sendo assim, analisando todos esses fatores, tentamos mostrar quais tipos de procedimentos devem-se utilizar para que se adequem melhor aos diferentes laboratórios. Sendo assim, visando a diminuir os gastos implícitos no processo todo e melhorar o tempo de análise das amostras, pois quando se trata de uma quantidade pequena de amostras a serem

analisadas, não há tanta diferença nas metodologias a serem seguidas, porém quando o número é extremamente alto, devemos repensar a logística do processo todo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram utilizados dois tipos de amostras de origem biológica: tecido muscular de um único peixe corvina-legítima (*Argyrosomus regius*) adquirido em peixaria no município de Botucatu-SP; e tecido vegetal de uma única folha de cacau (*Theobroma cacao*) cultivado em Ilhéus-BA. Foi escolhida como amostra animal o musculo do peixe, pois é o local com maior deposição desses isótopos e com maior porção para a retirada de um número grande de amostras. Este critério também foi adotado para a folha de cacau, como se trata de um vegetal com folhas grandes, conseguimos retirar de um único espécime grande quantidade de amostras para o teste.

2.2. Preparação das amostras

As amostras foram submetidas a diferentes processos de preparação para análise isotópica: moídas e fragmentadas. Para as amostras que iriam passar pelo processo de moagem, foi utilizado o moinho de criogenia do nosso laboratório. O processo consiste em colocar pedaços das amostras em um recipiente específico da técnica de análise, colocá-los por 5 minutos em nitrogênio líquido, onde este, por ter uma temperatura extremamente baixa (-194°C), congela rapidamente a amostra. Com isso quando passa pelo processo de moagem, ela se quebrará mais facilmente, deixando-a com grãos finos e homogêneos. Após a etapa do nitrogênio líquido, as amostras foram colocadas no moinho durante 5 minutos a 900 rpm. Ao fim desse procedimento, colocamos cada amostra moída em *eppendorfs* com suas especificações anotadas e guardamos até o processo de pesagem. As amostras que foram analisadas em fragmentos não passaram pelo processo de moagem. Foram retirados fragmentos de diferentes regiões tanto do peixe Corvina quanto da folha de Cacau. A folha por já estar seca não precisou passar pela estufa, porém, as amostras de peixe tiveram essa necessidade. Os fragmentos de músculo de peixe foram deixados na estufa por aproximadamente 24 horas. Após isso foi feito o processo de pesagem. Para realizar tal tarefa era necessário o auxílio de um bisturi para cortar os fragmentos da folha e do peixe até atingirem o peso ideal.

2.3. Pesagem das amostras

Ambas as amostras biológicas, tanto moídas quanto fragmentadas, passaram pelo processo de pesagem. Para a análise separada de carbono e nitrogênio, utilizamos o peso padrão de cada já empregado no laboratório em seu cotidiano, portanto para ^{13}C utilizamos a faixa de 50-70 μg e para ^{15}N foram utilizados 4000-5000 μg . Esses valores são tabelados, e a discrepância dos valores adotados na pesagem de cada tipo ocorre devido à abundância extrema de carbono nos tecidos analisados e desprovemento de nitrogênio. Para as amostras analisadas juntas, utilizamos a faixa de 4000-5000 μg , considerando que nessa faixa de peso teria a quantidade suficiente de carbono e nitrogênio que seriam analisados. Para cada análise realizada, utilizam-se diferentes tipos de cápsulas no *IRMS*. As cápsulas de prata são empregadas para análises de deutério e oxigênio; já para análise de carbono e nitrogênio, utilizaram-se cápsulas de estanho. Portanto todas as amostras analisadas neste estudo, foram colocadas em cápsulas de estanho.

Durante o processo de pesagem, notamos uma dificuldade maior quando se trata de amostras em pedaço tanto de tecido animal, quanto de vegetal, pois como trata-se de amostras inteiras, fica difícil cortar pedaços com grandezas na ordem de μg , já quanto se trata de amostras moídas, o processo fica notavelmente mais fácil.

2.4. Análise das amostras através do (EA-IRMS)

O EA-IRMS (*Delta V Advantage Isotope Ratio MS – Thermo Scientific, Germany*) é o equipamento utilizado para a análise de todas as amostras. A amostra é colocada em cápsula de estanho e injetadas no EA (*Flash 2000 Organic Elemental Analyzer – Thermo Scientific, Germany*) de fluxo contínuo de hélio (He) (este é chamado de gás de arraste, pois é ele que carrega a amostra no interior do equipamento), ao iniciarem-se as análises são injetados 10 mL de oxigênio (O_2) para efetuar a combustão da amostra, com temperatura de 1050 °C que no flash (momento da queima) vai a 1800 °C. Na combustão os gases gerados passam pelo catalisador de combustão, óxido de crômio (CrO_3). Os elementos de oxidação, entre os quais CO_2 , no caso da amostra ou padrão conterem azoto, NO_x , passam então pelo tubo de redução mantido à temperatura de 650 °C, contendo cobre e óxido de cobre, onde os óxidos de azoto (NO , N_2O e N_2O_2) são reduzidos a N_2 e o excesso de oxigênio é removido.

Os elementos produzidos, CO_2 , N_2 , SO_2 e H_2O passam através de uma armadilha química de perclorato de magnésio para reter o elemento H_2O , e os outros elementos são separados em uma coluna cromatográfica.

2.5. Teste estatístico

Utilizamos para comparação dos resultados foi empregado o teste *one-way ANOVA* (análise de variâncias), que leva em consideração os valores de média, desvio padrão (Desv-P), constante de variação (CV) e p (também chamado de nível descritivo ou probabilidade de significância) que é a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como se trata de um assunto pouco relatado, não há muitas pesquisas relacionadas a esse tipo de teste. Contudo, tínhamos um conhecimento prévio do fabricante do *IRMS* de que não haveria diferença significativa nos resultados da análise isotópica com relação aos diferentes métodos de preparo das amostras. Porém este projeto visa não só ao resultado em si, mas também todo o trabalho envolvido do início ao fim. Dessa forma fizemos um estudo para que, dependendo do laboratório onde sejam realizados os testes, consigam escolher qual metodologia seria mais satisfatória para a realização as análises de forma mais rápida, barata e com precisão nos resultados, otimizando assim todo o processo. Deste modo fizemos uma avaliação de tempo/trabalho da preparação das amostras e forma de análise.

Por mais que as especificações do fabricante garantissem que os testes poderiam ser realizados com as metodologias que propomos no estudo, dizendo que não haveria diferença alguma nos resultados, durante a execução do projeto, tínhamos uma hipótese de que alguma diferença poderia ocorrer. Quando analisamos amostras moídas separadamente no início da coluna, além da amostra estar totalmente homogeneizada, a máquina estava preparada para analisar um único isótopo. Com isso, a diluição e a focalização se mantêm de certa forma constante. Por conseguinte, quando analisamos uma amostra fragmentada, C e N juntos e final da coluna, teoricamente, a amostra não está homogênea. Desta forma, a máquina ficará diluindo e mudando a sua focalização a cada análise e a coluna já não estará em sua performance total. Portanto através do estudo, poderemos sanar essas dúvidas.

Com isso, os valores obtidos das análises isotópicas de C e N nas amostras de músculo de peixe e nas folhas de cacau estão apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e 4 e divididas entre: início/final da coluna cromatográfica, em duas formas de preparo: moídas/fragmentadas e analisadas de duas formas: simultânea/separada.

Tabela 1. Comparação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) em amostras de músculo de peixe analisadas, no início (I) e final (F) da coluna cromatográfica, em amostras moídas (M) e em fragmentos (Fg), analisadas simultaneamente (J) e separadamente (S) no IRMS.

	IMJ	IMS	IFgJ	IFgS	FMJ	FMS	FFgJ	FFgS
	15,90	14,80	16,28	15,42	15,94	13,03	16,01	13,29
	15,67	14,43	15,51	14,81	15,65	12,26	15,28	13,08
	15,93	14,66	15,93	14,89	15,79	12,74	15,36	12,12
	15,94	14,54	15,74	14,76	15,85	12,50	15,27	13,04
	15,85	14,98	15,70	15,13	15,86	13,04	15,54	12,52
	16,19	15,00	15,61	15,40	15,85	13,24	15,23	12,39
	15,75	14,65	15,54	14,97	15,67	12,51	15,33	12,61
	15,67	14,62	15,13	15,37	15,58	12,23	15,34	12,79
	15,64	14,85	15,27	14,91	15,25	12,37	15,13	13,31
	15,68	14,85	15,44	15,02	15,25	12,44	15,07	12,89
Média	15,82	14,74	15,61	15,07	15,67	12,64	15,36	12,80
Desv-P	0,17	0,19	0,33	0,25	0,25	0,36	0,26	0,39
CV	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02	0,03
p (J & S)	0,0001		0,0005		0,0001		0,0001	
p (M & P)	0,0400		0,0009		0,0010		0,4187	
p (I & F)	0,0197		0,0001		0,0041		0,0001	

Não era esperado que os resultados da tabela 1 fossem diferentes estatisticamente, pois trata-se de amostras retiradas de músculo de um único espécime. Portanto houve uma diferença significativa entre os resultados, pois de acordo com as informações do fabricante os valores distribuídos na tabela, deveriam ser todos próximo. Contudo quando analisamos os resultados, vemos que a reprodutibilidade do procedimento está de acordo e dentro do padrão, pois ao olhar os valores da média, vemos que esta sofre variação de 1‰. Esta diferença é uma margem aceitável. Porém quando analisamos o desvio padrão, vemos que está alto, pois o ideal seria por volta de 0,06 a 0,08. Por fim, analisando os resultados estatísticos p, o único resultado fora do esperado, que sofre variação significativa, é a comparação entre os grupos FMS e FFgS. Outra coisa que notamos foi que o grupo de amostras analisadas simultaneamente, o valor do $\delta^{15}\text{N}$ permanece maior em comparação com o separado. Cabe ressaltar também que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ na tabela 1 representam que este peixe está em um nível trófico alto, portanto se alimenta de outros animais aquáticos, devido a seus valores estarem entre 12,12‰ e 16,28‰.

Tabela 2. Comparação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) em amostras de musculo de peixe analisadas, no início (I) e final (F) da coluna cromatográfica, em amostras moídas (M) e em fragmentos (Fg), analisadas simultaneamente (J) e separadamente (S) no IRMS.

	IMJ	IMS	IFgJ	IFgS	FMJ	FMS	FFgJ	FFgS
	-16,44	-17,67	-16,69	-17,91	-16,72	-17,74	-16,74	-17,81
	-16,91	-18,17	-16,68	-17,58	-16,92	-18,08	-20,74	-17,98
	-17,12	-18,24	-16,80	-17,71	-20,52	-18,25	-16,68	-18,15
	-16,96	-18,12	-17,10	-18,51	-16,98	-18,57	-16,76	-18,16
	-16,92	-17,87	-16,89	-17,55	-20,47	-18,32	-20,35	-17,91
	-18,80	-17,87	-16,83	-17,66	-16,87	-18,33	-16,59	-18,03
	-16,85	-18,84	-16,88	-17,92	-20,35	-18,17	-20,67	-17,94
	-16,78	-17,98	-16,45	-17,98	-16,65	-17,88	-16,69	-18,25
	-16,76	-17,91	-19,61	-17,56	-16,57	-18,26	-16,76	-18,25
	-16,91	-17,91	-19,83	-17,45	-16,84	-18,51	-20,77	-18,22
Média	-16,84	-18,00	-17,37	-17,78	-17,89	-18,21	-16,74	-18,07
Desv-P	0,18	0,18	1,25	0,31	1,77	0,26	2,03	0,16
CV	0,01	0,01	0,07	0,02	0,10	0,01	0,12	0,01
p: J e S	0,0019		0,3849		0,5758		0,7629	
p: M e P	0,2074		0,0556		0,5926		0,0983	
p: I e F	0,1206		0,2410		0,2306		0,0273	

Na tabela acima, vemos o mesmo problema da tabela 1. Como se tratam de amostras retiradas do mesmo espécime, não deveria haver discrepâncias nos resultados. O que vemos aqui é que o valor das médias de cada grupo teve uma diferença significativa. O desvio padrão teve valores discrepantes; os maiores valores de desvio padrão são atribuídos ao grupo de amostras analisadas simultaneamente no IRMS. Uma justificativa plausível para esta discrepância seria que devido à quantidade de massa ser muito alta, entre 4000 a 5000 μg pode ser que o processo de diluição dos gases, seja o responsável por esta diferença. Por fim, o coeficiente de variação, também sofreu uma variação grande; quando analisamos o p de todos os grupos, vemos que os grupos comparados IFgJ e IFgS / FMJ e FMS / FFgJ e FFgS / IMJ e IFgJ / IFg e FMJ / FMS e FFgS / IMJ e FMJ / IMS e FMS / IFgJ e FFgJ tiveram diferenças significativas nos resultados, portanto não foram satisfatórios. Já as comparações dos outros grupos estão dentro do esperado. Curiosamente o que notamos neste teste é o contrário da tabela 1, pois aqui o teste feito separadamente se mostrou com valores de $\delta^{13}\text{C}$ mais altos quando comparados ao grupo analisado simultaneamente.

Tabela 3. Comparação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) em amostras folha de cacau, analisadas no início (I) e final (F) da coluna cromatográfica, em amostras moídas (M) e em fragmentados (Fg), analisadas simultaneamente (J) e separadamente (S) no IRMS.

	IMJ	IMS	IFgJ	IFgS	FMJ	FMS	FFgJ	FFgS
	4,72	4,85	4,74	5,18	4,97	5,15	6,43	5,26
	4,61	4,85	4,58	5,32	4,52	5,29	5,84	5,37
	4,41	4,76	4,65	5,37	4,56	5,49	6,03	5,20
	4,95	4,82	4,69	5,37	3,91	5,55	5,53	5,24
	4,67	4,85	4,64	5,08	4,61	5,18	5,55	5,16
	4,79	4,91	4,62	5,08	5,40	5,37	5,33	5,18
	4,62	4,90	4,68	5,15	5,95	5,30	5,38	5,30
	4,83	4,86	4,61	5,13	5,86	5,30	8,49	5,12
	4,73	4,91	4,59	5,05	6,00	4,98	5,73	5,24
	4,60	4,98	4,63	5,22	6,84	5,15	6,08	5,28
Média	4,60	4,98	4,63	5,22	5,27	5,28	5,74	5,24
Desv-P	0,15	0,06	0,05	0,12	0,91	0,17	0,35	0,07
CV	0,03	0,01	0,01	0,02	0,17	0,03	0,06	0,01
p: J e S	0,0052		0,0001		0,9659		0,0267	
p: M e P	0,3208		0,0001		0,0569		0,5186	
p: I e F	0,0848		0,0002		0,0011		0,2968	

Neste experimento, como retiramos amostras de uma única folha de cacau, os valores distribuídos na tabela 3 deveriam sofrer variação mínima, porém na prática vemos que houve discrepância entre os valores. A média variou por volta de 1‰, o que é uma variação aceitável. O desvio padrão teve uma variação alta entre os valores e no teste p para junto/separado o único grupo que variou significativamente foi a comparação entre FMJ e FMS. No p do teste moído e fragmentado os grupos que ficaram com valores fora do esperado foram as comparações de IMJ e IFgJ / FMS e FFgS. Por fim o teste de início e final da coluna cromatográfica tiveram dois valores dentro do esperado e dois fora. A comparação dos grupos IMJ e FMJ, teve uma leve diferença quando comparados seus resultados, já a comparação entre IFgS e FFgS mostrou grande diferença. A comparação dos grupos IMS e FMS / IFgJ e FFgJ não teve variação significativa nos resultados, portanto os resultados foram satisfatórios.

Tabela 4. Comparação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) em amostras de folha de cacau, analisadas no início (I) e final (F) da coluna cromatográfica, em amostras moídas (M) e em fragmentados (Fg), analisadas simultaneamente (J) e separadamente (S) no IRMS.

	IMJ	IMS	IFgJ	IFgS	FMJ	FMS	FFgJ	FFgS
	-30,81	-31,18	-18,79	-30,83	-31,11	-30,95	-30,62	-31,23
	-16,05	-31,07	-25,98	-30,97	-31,23	-30,28	-30,72	-30,80
	-31,04	-30,95	-26,91	-30,75	-31,63	-31,13	-30,73	-31,39
	-31,02	-31,19	-25,84	-31,06	-30,95	-31,07	-30,83	-31,19
	-30,84	-31,08	-17,59	-31,01	-30,71	-31,18	-30,98	-31,52
	-31,02	-31,10	-21,16	-30,78	-30,65	-31,10	-30,78	-30,57
	-30,84	-31,15	-19,69	-30,92	-30,64	-31,17	-30,89	-31,31
	-30,97	-31,28	-14,48	-30,89	-30,60	-31,24	-30,77	-31,33
	-30,81	-31,18	-22,46	-31,03	-30,60	-31,23	-30,78	-31,50
	-30,95	-31,16	-27,16	-30,81	-30,55	-31,15	-30,82	-30,82
Média	-30,93	-31,13	-22,01	-30,90	-30,87	-31,15	-30,80	-31,27
Desv-P	0,10	0,09	4,40	0,11	0,36	0,09	0,10	0,32
CV	0,01	0,01	0,20	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
p: J e S	0,2808		0,0001		0,3206		0,0045	
p: M e P	0,0110		0,0002		0,5822		0,2765	
p: I e F	0,3740		0,3550		0,0001		0,0221	

Os valores dispostos nesta tabela são de carbono, portanto como se trata de amostras retiradas de uma única folha, também não deveriam sofrer variações em seus resultados. Porém o que analisamos aqui é que devido a média do grupo IFgJ ser muito baixa, causa uma discrepância enorme quando comparado com as outras colunas. Esse evento pode ter ocorrido novamente devido a diluição da amostra quando analisadas simultaneamente no IRMS. Quando analisamos o desvio padrão de todos os grupos, vemos que não há variação significativa, isso mostra que essa tabela se aproxima do ideal, e que todas as outras deveriam ter dado valores com pequenas variações como estas. O coeficiente de variação também não sofreu grandes variações, com exceção do grupo já mencionado. Contudo quando analisamos o p de todos os grupos, vemos que metade dos resultados foram dentro do esperado, pois resultou em $p < 0,05$. Os valores comparados que deram diferença, com $p > 0,05$ foi quando analisados os grupos junto e separado IMJ e IMS / FMJ e FMS. Já quando analisamos o p de moído e fragmentado, os valores que tiveram diferenças significativas foram os grupos FMJ e FFgJ / FMS e FFgS. Por fim, quando analisado o p dos grupos início e final da coluna, temos valores inesperados na comparação dos grupos IMJ e FMJ / IMS e FMS.

No decorrer da preparação do presente estudo, tivemos algumas dificuldades para realizar de forma mais rápida o projeto. Algumas intercorrências como reformas no laboratório, organização dos equipamentos, manutenção dos equipamentos, quedas de energias na universidade que danificaram a confiabilidade dos primeiros resultados obtidos.

Portanto tivemos que refazer o processo algumas vezes, pois, além do meu projeto, o departamento analisa outras pesquisas, de diferentes empresas. Devido a isso, a análise no EA-IRMS não se transcorreu de forma rápida. Porém nada grave aconteceu que atrapalhasse os prazos e a confiabilidade dos resultados obtidos nesse período.

Durante o estudo, os parâmetros avaliados não foram conclusivos, porém descobrimos que outros fatores podem estar relacionados a essa variação entre os resultados. Muitos deles foram descobertos no decorrer do projeto e não foram testados nesse trabalho, como por exemplo, focalização e desfocalização da máquina, diluição dos gases e o sinal em mili-volts do gráfico. Este fator quando analisado no software, há valores que não são lidos quando colocados valores de massas grandes para serem analisadas. Portanto nosso objetivo foi iniciar testes relacionados a essa área para que estudos futuros consigam esclarecer as dúvidas que se tem na metodologia de análise e na variação dos resultados.

4. CONCLUSÃO

Concluimos que as diferentes metodologias da preparação das amostras, tiveram discrepâncias nos resultados, principalmente quando as análises foram feitas simultaneamente. Essa variação é relativamente pequena, porém existe.

Cabe ressaltar que cada procedimento de preparo de amostras e análise de C e N (simultânea ou separada), dependem do objetivo de cada laboratório. Se na visão do laboratório essa diferença não for significativa e o intuito do trabalho é maior reprodutibilidade, menor tempo de análise e com menos gastos possíveis de materiais e gases, essa é a melhor metodologia independentemente dos testes ocorrerem no início e no final da coluna cromatográfica.

Neste ínterim, laboratórios que visam a mínima diferença entre os resultados, e necessitam da repetitividade dos mesmos, a melhor maneira de se obter é moendo a amostra para deixar o mais homogêneo possível e analisar carbono e nitrogênio separadamente. Assim a diluição dos gases e a focalização da máquina não ficarão variando a cada queima das amostras; sendo assim, minimizando possíveis discrepâncias nos resultados. Este método trará maiores gastos, pois os testes serão duplicados, então ao invés de analisar mil amostras em uma única coluna e ter o resultado de C e N, o técnico deverá colocar separadamente e isso implicará na diminuição da vida útil da coluna cromatográfica e maior gasto de gases.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENSON, S. et al. Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry - A review. **Forensic Science International**, v. 157, n. 1, p. 1–22, 2006.
- BRENNA, J. et al. High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 16, n. 5, p. 227–258, 1998.
- FERREIRA, A. I. J. V. Espectrometria de massa de razões isotópicas. p. 1–348, 2008.
- FRY, B. **Stable Isotope Ecology**. New York, NY: Springer New York, 2006.
- GUERIN, A. J.; JENSEN, A. C.; MCGILL, R. A. R. Effects of distilled water rinsing on stable isotope ratios of acid-treated marine invertebrate (Paguridae) samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 27, n. 18, p. 2051–2056, 2013.
- MEIER-AUGENSTEIN, W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 842, n. 1–2, p. 351–371, 1999.
- MICHENER, R. H.; LAJTHA, K. **Stable isotopes in ecology and environmental science**. [s.l.: s.n.].
- MUCCIO, Z.; JACKSON, G. P. Isotope ratio mass spectrometry. **The Analyst**, v. 134, n. 2, p. 213–222, 2009.
- ROYER, A. et al. Carbon, nitrogen and oxygen isotope fractionation during food cooking: Implications for the interpretation of the fossil human record. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 163, n. 4, p. 759–771, 2017.
- SABATELLI, A. D.; PEARSON, A.; JASPER, J. P. Process Patent Protection via Analysis of Stable Isotope Ratios. **Organic Process Research & Development**, v. 21, n. 7, p. 956–965, 2017.
- WANG, Y.; SESSIONS, A. L. Memory Effects in Compound-Specific D / H Analysis by Gas Chromatography / Pyrolysis / Isotope-Ratio Mass Spectrometry. v. 80, n. 23, p. 9162–9170, 2008.
- WIESER, M. E.; BRAND, W. A. Isotope Ratio Studies Using Mass Spectrometry. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**, v. 2, p. 1224–1236, 1999.
- ZANASI, R. et al. Determinations of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Carbon Isotope Ratio. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 78, n. 9, p. 3080–3083, 2006.