

**UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU- CAMPUS BOTUCATU**

VITOR HUGO MACHADO BREDA

Processamento de amostras para análise isotópica



Botucatu
2024

VITOR HUGO MACHADO BREDA

Processamento de amostras para análise isotópica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Física Médica.

Aluno: Vitor Hugo Machado Breda
Orientador: *Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa*

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Breda, Vitor Hugo Machado.

Processamento de amostras para análise isotópica /
Vitor Hugo Machado Breda. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física
Médica) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto
de Biociências, Botucatu

Orientador: Vladimir Eliodoro Costa

Capes: 10504001

1. Isótopos - Análise. 2. Carbono. 3. Nitrogênio.
4. Espectrometria de massa. 5. Preparo de amostras (Química).

Palavras-chave: Análise isotópica; C; EA/IRMS; N; Preparação
de amostra.

VITOR HUGO MACHADO BREDA

PESAGEM DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE ISOTÓPICA

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências
para a obtenção do título de
Bacharel, do curso de Graduação em
Física Médica.

Botucatu, ____ de _____ de ____.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa
UNESP- Instituto de Biociências de Botucatu

Dr. Juliana Célia Denadai
CIE- Centro de Isótopos Estáveis "Prof. Dr. Carlos Ducatti"

Me. Samuel Perri Gimenes
Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia de Botucatu

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus Orixás e meus guias que sempre se mostram presentes e me deram a oportunidade de ingressar em uma universidade pública e a me formar.

Em segundo lugar agradeço a todos que me acompanharam nessa jornada, em primeiro lugar em memória ao meu avô Alidio que sempre quis ver me formar em uma universidade, em segundo aos meus pais Marcos e Adriana, a minha irmã Ana, e as minhas avós Maria Aparecida, Dirce e Telma e meu avô Joaquim.

Em terceiro à república Palacete Assobradado que me acolheu e se tornou a minha família nessa jornada e na nova cidade, em especial ao Lucas que sempre esteve comigo em todos os momentos.

Agradeço ao CIE- Centro de Isótopos Estáveis e a todos os funcionários e colegas, principalmente a Juliana, Cibele, Nádia, Carlinhos e Mariana que me aguentaram nesses quase três anos no laboratório, juntamente aos labamigos Samuel, Martina e Beatriz que proporcionaram ótimos momentos todos os dias.

Agradeço também ao meu orientador Vladimir por sempre me acalmar durante o andamento das pesquisas e se tornar um grande amigo durante todo o tempo e me dar uma chance de vivenciar a rotina de laboratório.

Além dos amigos que fiz durante este trajeto, como Isabela, Leonardo, Gustavo Beatriz, Andrea, e não menos importante a Fran que foi minha professora no ensino médio e carrego ela até os dias de hoje no coração.

E agradeço também a Fundibio pela concessão da bolsa de incentivo a pesquisa.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe
tudo. Todos nós sabemos alguma
coisa. Todos nós ignoramos alguma
coisa.”

(FREIRE, 2002, p. 69)

RESUMO

Os isótopos são traçadores naturais em diversas áreas: forense, autenticidade e rastreabilidade de alimentos e bebidas, e, detecção de dietas de animais utilizando os isótopos de CHON'S (Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre). No entanto, a preparação das amostras pode impactar na variação dos resultados. As análises de carbono diferenciam plantas C₃ e C₄, com base nos ciclos fotossintéticos, enquanto as análises de nitrogênio são influenciadas pela via de absorção, seja por via gás nitrogênio ou adubação tanto por matéria orgânica e fertilizantes industriais. As porcentagens de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) têm aplicações nas áreas de enriquecimento de solo e sedimentos, sendo possível identificar a porcentagem dos isótopos na massa encapsulada. Este estudo objetivou identificar o impacto do processamento das amostras influência nos resultados, considerando os processos de coleta, armazenamento, secagem, moagem e quantidade de massa encapsulada em estanho com seu respectivo sinal de sensibilização do espectômetro de massa. Foram medidas as razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, além de COT e NT, utilizando padrões internacionais certificados pela IAEA e USGS incluídas amostras de folhas coletadas na UNESP Botucatu. Foram realizados dois processamentos: o Processamento 1 investigou identificar a quantidade de massa, de 50 a 700 μg , para garantir um sinal adequado no espectômetro de massa, EA/IRMS, além disso foram coletadas folhas na UNESP Botucatu, o primeiro grupo passando por separação de secções em base, topo, meio esquerdo, meio direito e base seguidos de secagem em estufa de convecção, o segundo grupo sendo secas em estufa de convecção e moídas, permitindo a análise de diferenças das razões isotópicas. Já o Processamento 2 verificou-se as condições de coleta e armazenamento. Amostras foram guardadas em sacos de papel, plástico ou mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas por 0, 24, 48 e 72 horas. Também investigou as condições de armazenamento de amostras, deixadas ao ambiente absorvendo umidade verificando os valores de COT e NT. Os resultados do Processamento 1 evidenciaram que a maior a porcentagem de carbono ou nitrogênio, menor a massa encapsulada evitando a saturação do equipamento, além disso, os resultados das folhas inteiras e seccionadas apresentaram diferenças estatisticamente relevantes, através do teste One- Way ANOVA e Teste Turkey, sendo as amostras moídas inteiras representando a razão isotópica real da amostra. Para o Processamento 2 os resultados das coletas de amostra evidenciaram a necessidade do processo de secagem logo após colhidas, independente do material em que são armazenadas e a dispensabilidade do nitrogênio líquido. Também verificado, a partir dos padrões, a influência da umidade nas análises de COT e NT, uma vez que a massa de água interfere nas das porcentagens, evidenciadas as diferenças estatísticas com os testes One- Way ANOVA e Teste Turkey.

Palavras-chave: Análise isotópica; EA/IRMS; Preparação de amostra; C; N;

ABSTRACT

Isotopes are natural tracers used in various fields such as forensics, food and beverage authenticity and traceability, and the detection of animal diets using CHONS isotopes (Carbon, Hydrogen, Oxygen, Nitrogen, and Sulfur). However, sample preparation can significantly impact in the results variability. Carbon analyses distinguish C3 and C4 plants based on their photosynthetic cycles, while nitrogen analyses are influenced by the absorption pathway, whether via nitrogen gas or fertilization with organic matter and industrial fertilizers. Total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) percentages are applied in soil and sediment enrichment studies, enabling the identification of isotopic percentages in the encapsulated mass. This study aimed to assess how sample processing impacts the results, focusing on collection, storage, drying, grinding, and the quantity of mass encapsulated in tin, along with its corresponding sensitivity signal in the mass spectrometer. Isotopic ratios $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were measured, along with TOC and TN, using international standards certified by IAEA and USGS including leaf samples collected at UNESP Botucatu. Two processing methods were performed: Processing 1 investigated the optimal amount of mass (50 to 700 μg) to ensure an adequate signal in the EA/IRMS mass spectrometer. Leaves collected at UNESP Botucatu were divided into two groups: the first was separated into sections (base, top, left middle, and right middle) and dried in a convection oven, while the second group was dried and ground, allowing the analysis of differences in isotopic ratios. Processing 2 assessed collection and storage conditions. Samples were stored in paper or plastic bags or immersed in liquid nitrogen and analyzed after 0, 24, 48, and 72 hours. Additionally, storage conditions were evaluated for samples left in ambient environments, where moisture absorption was monitored for its effect on TOC and TN values. The results from Processing 1 showed that the higher the percentage of carbon or nitrogen, the lower the encapsulated mass needed to avoid equipment saturation. Furthermore, significant statistical differences were observed between whole and sectioned leaves, as determined by One-Way ANOVA and Tukey tests, with ground samples providing the most accurate representation of the isotopic ratios. For Processing 2, the results highlighted the necessity of drying samples immediately after collection, regardless of the storage material, and the dispensability of liquid nitrogen. Moreover, the influence of moisture on TOC and TN analyses was confirmed, as water mass interfered with percentage calculations, with statistical differences evidenced by One-Way ANOVA and Tukey tests.

Palavras-chave: Isotopic Analysis; EA/IRMS; Preparation's sample; C; N;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1: Esquema dos ciclos fotossintéticos de plantas C₃, C₄ e CAM</i>	<i>2</i>
<i>Figura 2: Massa vs.%Carbono.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 3: Massa vs.%Nitrogênio</i>	<i>9</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Resultados experimentais comparados com os valores teóricos calculados para carbono e nitrogênio.....</i>	<i>9</i>
<i>Tabela 2: Comparação de NT, COT, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no comprimento das folhas .</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 3: Variação da média dos valores de NT, COT, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no comprimento das folhas</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 4: Valores de NT, COT, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nos três diferentes métodos de coleta e armazenamento das amostras</i>	<i>112</i>
<i>Tabela 5: Variação das médias dos valores de NT, COT, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nos diferentes métodos de coleta e armazenamento das folhas</i>	<i>123</i>
<i>Tabela 6: Valores de NT, COT das amostras secas estufa e deixadas ao ambiente para absorver umidade.....</i>	<i>134An</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EA-IRMS	Elemental analyser isotope-ratio mass spectrometer
IAEA	International Atomic Energy Agency
¹³ C	Carbono-13
¹⁵ N	Nitrogênio-15
² H	Hidrogênio-2
¹⁸ O	Oxigênio-18
³⁴ S	Enxofre-34
COT	Carbono Orgânico Total
NT	Nitrogênio Total
mV	miliVolts

SUMÁRIO

1.Introdução.	1
2.Metodologia.....	5
2.1 Processo 1.....	5
2.2 Processo 2.....	7
2.3 Testes estatísticos.....	9
3.Resultados.....	8
3.1 Processo 1.....	8
3.2 Processo 2.....	11
4.Conclusão.....	14
5.Referências.....	15

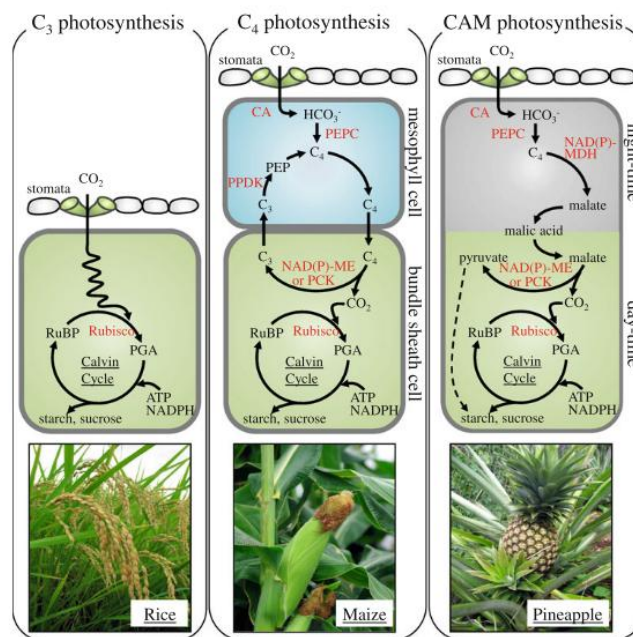
1. Introdução

A análise isotópica usando sistema de analisador elementar com espectrômetro de massa de razão isotópica, traduzida do inglês *Elemental Analyzer-Isotope Ratio Mass Spectrometer* abreviada como EA-IRMS, tem como princípio de funcionamento a análise de íons moleculares, detectando-os qualitativa e quantitativamente pela respectiva taxa m/z (massa/carga) abundante (Gehre; Strauch, 2003). Após a combustão da amostra no EA, os íons moleculares colidem com receptores pré-determinados (Kracht, 2010) a partir da trajetória influenciada pela massa molecular do gás formado, sendo gerados sinais de sensibilização do equipamento dado em milivolts (mV) no IRMS (Brenna et al., 1997). O EA-IRMS possui aplicações em diversas áreas, como na perícia criminal (Shibuya et al., 2006) e na análise de alimentos de origem animal (Petinati et al., 2018) e vegetal (Nietner et al., 2014) com as medições de ^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{18}O e ^{34}S .

A análise de Carbono, $\delta^{13}\text{C}$ (‰), é utilizada em grande escala por amostras de origem vegetal como as folhas; animal como músculo, unha e pelo; e matéria orgânica como solo, sedimento e rocha ígnea. (Dunn et al., 2018). As plantas, possuem diferenças em seus ciclos fotossintéticos, sendo classificadas em: plantas C_3 , C_4 e plantas CAM (figura 1).

As plantas C_3 discriminam o gás carbônico com ^{13}C (Smith; Epstein, 1971) resultando em valores isotópicos mais negativos em intervalo de -30‰ à -24‰ (Rhodes et al., 2010), tendo como principais representantes o arroz e o trigo. As plantas C_4 , por outro lado, não possuem essa seletividade na absorção do CO_2 atmosférico (Cannell; Thornley, 1998), apresentando a razão isotópica intervalo de -20‰ à -10‰, representados majoritariamente pela cana-de-açúcar e milho. E, as plantas CAM, é uma categoria as quais podem se comportar tanto como plantas C_3 , bem como plantas C_4 , tendo como principais representantes o abacaxi e o cactus (Yamori; Hikosaka; Way, 2014).

Figura 1: Esquema dos ciclos fotossintéticos de plantas C₃, C₄ e CAM



Fonte: (Yamori; Hikosaka; Way, 2014)

Assim, $\delta^{13}\text{C}$ é empregado pela diferença da razão isotópica das plantas de acordo a classe a que pertencem, sendo possível verificar a legalidade de sucos de polpa de caju através do enriquecimento isotópico relativo (Figueira et al., 2011) ou em adulterações de méis com açúcares (Souza-Kruliski et al., 2010).

Na análise de Nitrogênio, $\delta^{15}\text{N}$ (‰), é possível distinguir a via de absorção das plantas, sendo através do gás nitrogênio atmosférico, N₂, ou adubação do solo, tanto por matéria orgânica, industrial ou ação de decompositores. Desta forma, as razões isotópicas possuem diferenças entre as vias de absorção, ou seja, as que absorvem nitrogênio atmosférico, como as leguminosas, possuem resultados entre 0 e 1‰ (Campanelli et al., 2024). As plantas que absorvem do solo devido a adubação, via decomposição de matéria orgânica os valores são maiores que 5‰ (Rhodes et al., 2010), e, as que absorvem via fertilizantes manufaturados de -2 a 2‰ (Li et al., 2023).

O Carbono Orgânico Total (COT) e o Nitrogênio Total (NT) são duas medidas de todos os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Ambos são empregados em pesquisas de enriquecimento de solo (Liu et al., 2023) e em

deposições desses isótopos em ecossistemas (Thiengo et al., 2024). O COT e NT são medidas da porcentagem de carbono e nitrogênio totais presentes na amostra. Essas medições possuem seus cálculos realizados pelo software que dependem das massas das alíquotas analisadas (Cobley; Pataki, 2019).

Algumas das problemática que envolvem a análise isotópica são os processos de preparação das amostras, que ocorrem antes da análise, tais como a secagem, homogeneização, coleta e armazenamento e a massa encapsulada. O processo de secagem da amostra é retirado a umidade, principalmente de material higroscópico, que possui grande afinidade e absorção de água, garantindo uma estabilidade da amostra e evitando a variação de peso, e das proporções isotópicas (Reay et al., 2023), devido a presença de água.

A secagem, no entanto, caso excessiva ou insuficiente podem gerar erros nos resultados. Pois, se realizada à alta temperatura, podem ocorrer perda de compostos e alterações dos isótopos presentes na amostra. O processo de secagem da amostra pode afetar diretamente a precisão e reprodutibilidade principalmente nas medições de COT e NT que dependem da massa (Bettez; Groffman, 2013). Sendo utilizadas técnicas e equipamentos que retiram a água absorvida, tais como a liofilização e o uso de estufas, tanto à vácuo como por convecção (Greenwood, 2018).

A homogeneização da amostra garante que a composição da amostra seja uniforme em toda alíquota, permitindo resultados mais precisos e reprodutíveis (Torres-Cobos et al., 2024). Considerando, ainda, que as massas das alíquotas encapsuladas utilizadas são em microgramas (μg), a não homogeneização, pode não representar o valor real da amostra.

Em materiais heterogêneos a variação dos componentes, incluídos os isótopos estáveis, não são distribuídos igualmente o que infere em resultados inconsistentes e causam maiores erros associados a essa variabilidade. O processo de homogeneização pode ser realizado de maneira manual, através do uso de pilões ou através de equipamentos como moinhos criogênicos que utilizam nitrogênio líquido para congelar a amostra e esferas de metal agitadas junto a amostra e realizam a moagem (Giannioti et al., 2024).

A coleta das amostras deve ser realizada de maneira cuidadosa, tanto para amostras de material vegetal, como de origem animal. De forma que este processo inicial garante a representatividade, qualidade e validade das análises, garantindo que a amostra reflita as características do ambiente ou sistema de estudo (Meinkoth; Allison, 2007).

O armazenamento, por sua vez, permite a rastreabilidade e a reutilização das amostras em estudos futuros. Em diversos contextos as amostras podem ser únicas e insubstituíveis, de maneira que o armazenamento correto é um componente da metodologia científica (Gordon et al., 2018).

Assim, tal processo diz respeito a manipulação, documentação e correto armazenamento de amostras, as quais em condições não apropriadas podem receber a influência de decompositores e vetores que invalidam a alíquota e causam resultados não confiáveis (Silverman et al., 2022).

Para diversos equipamentos de espectrometria de massa, a quantidade da amostra encapsulada e introduzida para análise devem estar dentro de uma faixa específica, de maneira a garantir a ionização adequada do equipamento, e, a consequente detecção adequada das medições de interesse (Xie et al., 2024). Assim, erros na pesagem das amostras pode alterar os resultados isotópicos, pois influenciam diretamente a precisão, exatidão e a confiabilidade dos resultados obtidos (Carter; Fry, 2013).

O erro associado a este processo são pesagens significativas que levam a superestimação ou subestimação das proporções isotópicas, as quais, comprometem a interpretação dos resultados (Szpak; Metcalfe; Macdonald, 2017). Desta forma, este trabalho teve como objetivo explorar os principais tópicos envolvendo a preparação e manuseio de amostras na análise isotópica. Desde a coleta das amostras vegetais até o processo de análise das mesmas pelos equipamentos, verificando a variação dos resultados através de diferentes métodos de coleta, secagem, armazenamento e massa encapsulada.

2. Metodologia

Para o processo de análise das amostras foi utilizado um sistema de espectrometria de massa por razão isotópica acoplado ao analisador elementar de combustão, EA-IRMS, para a determinação das razões isotópicas de carbono e nitrogênio. Com resultados expressos em diferença relativa da razão isotópica com uma razão padrão conforme a equação 1:

$$\delta \ ^iE_{(‰)} = \frac{R(^iE/^jE)_{amostra}}{R(^iE/^jE)_{padrão}} - 1 \quad (1)$$

na qual E representa o elemento com ⁱE o isótopo menos abundante, ¹³C ou ¹⁵N, e ^jE o isótopo mais abundante, ¹²C e ¹⁴N, os resultados adimensionais expressos em permil (‰) (LI et al., 2024). As razões padrões de carbono R(¹³C/¹²C)_{VPDB} e a razão padrão para nitrogênio R(¹⁵N/¹⁴N)_{Air} são constantes fornecidas pela CIAAW (Commision on Isotopic Abundance and Atomic Weight) e a IUPAC (International Unicon of Pure and Applied Chemistry)

Além desta medida, também foi realizada a porcentagem de C e N total da amostra, COT e NT, os quais as massas pesadas das alíquotas são utilizadas pelo software. Antes das análises das os as amostras passaram por dois tipos de procedimentos dados como Processo 1 e Processo 2.

2.1 Processo 1

Foram utilizados padrões com COT e NT conhecidos visando, neste processo relacionar a massa da alíquota a ser encapsulada em estanho com COT ou NT presente, verificando a variação dos valores isotópicos com a insaturação ou saturação do equipamento (BALINT et al., 2024).

Os padrões utilizados foram: Ureia, USGS62 e Acetanilida com COT iguais a: 20,10%, 49,50% e 71,08%, respectivamente, e NT iguais a: 46,68%, 28,8% e 10,33%. As amostras foram pesadas com massas de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 µg (WANG et al., 2021).

Com a utilização da nota técnica (KRACHT, 2010) a qual indica o sinal ideal e a amplitude, em mV para cada análise, os valores das massas ideais encontradas foram 40 µg para COT e 70 µg para NT.

As amplitudes foram classificadas em mínima, ideal e máxima para ambas as análises, de maneira que para carbono foram consideradas as amplitudes de 5000, 6000 e 7000 mV, respectivamente, e para nitrogênio foram consideradas as amplitudes de 3000, 4000 e 5000 mV.

Os cálculos para a massa ideal de C e N foram realizados através da equação 2, comparando as amplitudes experimentais com os valores teóricos obtidos através das notas.

$$Massa\ ideal_{amostra} = Massa\ ideal_{equipamento} \cdot \%E \quad (2)$$

Realizados os gráficos relatando as diferenças das porcentagens do elemento (%E), C ou N, com a massa da amostra encapsulada em estanho.

Além disso, foram coletadas duas folhas de três árvores do campus da Unesp em Botucatu. Para o Grupo 1 as amostras foram separadas em três partes principais, base (B), meio (M) e topo (T), com cerca de 5cm cada e a parte do meio subdividida em duas, meio esquerdo (ME) e meio direito (MD). O Grupo 2 não foi submetido a nenhum processo de separação de cada seção da amostra, seguindo apenas aos processos de preparação da etapa seguinte.

Após a coleta e separação das amostras, os dois grupos foram secos em uma estufa por convecção à 45°C por 48h, após a secagem o Grupo 2 foi submetido ao processo de moagem criogênica utilizando o moinho SPEX SamplePrep Geno/Grinder 2010 de maneira a homogeneizá-las, feito este processo, foram retiradas alíquotas com massa entre 2000 e 2500 µg de cada seção.

Dado estes processos de pesagem para os dois grupos as amostras foram analisadas utilizando um sistema de espectrometria de massa por razão isotópica com analisador elementar de combustão EA-IRMS com análise de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, NT e COT. Desta forma este processo define o intervalo correto das massas para análise, e, também, verificou a variabilidade isotópica de materiais heterogêneos comparado aos homogeneizados.

2.2 Processo 2

Neste processo foram coletadas 11 amostras, de uma mesma árvore no campus da Unesp Botucatu, submetidas à três grupos com tratamentos diferentes durante a coleta e armazenamento antes da secagem.

No Grupo A, as amostras foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos (CECCHETTI et al., 2020) por 0 (A0), 24 (A24), 48 (A48) e 72 horas (A72). No Grupo B as amostras foram coletadas e mergulhadas em nitrogênio líquido por 8s cada amostra, armazenadas em sacos plásticos por 0 (B0), 24 (B24), 48 (B48) e 72 horas (B72). No Grupo C as amostras foram coletadas e armazenadas em sacos de papel por 0 (A0), 24 (C24), 48 (C48) e 72 horas (C72).

Após estes tratamentos as amostras foram secas em estufa de convecção por 48h à 45°C e moídas por meio de um moinho criogênico SPEX SamplePrep Geno/Grinder 2010, e posteriormente pesadas em cápsulas de estanho com massa na faixa de 2000 a 2500 µg.

Também foram utilizados padrões internacionais certificados, sendo eles USGS61 e USGS62, com valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ conhecidos. Essas amostras foram separadas em dois grupos: 1) as alíquotas absorveram a umidade ambiente; 2) as amostras foram secas em estufa à vácuo por 5 dias, com temperatura a 40°C e -700 mmHg. Ambos os grupos foram encapsulados em estanho e analisados pelo sistema EA-IRMS para obter os valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, NT e COT verificando as variações dos valores isotópicos dos diferentes métodos de coleta e armazenamento das amostras.

2.3 Testes estatísticos

Na análise dos dados foi utilizado o programa SigmaPlot 15.0 e teste estatístico o *One-Way ANOVA* (análise de variâncias), o qual leva em consideração os valores de média, desvio padrão (Desv-P), constante de variação (CV) e p (probabilidade de significância), que é probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou a mais extrema que aquela observada, e o teste Turkey, método de comparação entre os dados.

3. Resultados e Discussão

3.1 Processo 1

Os cálculos preliminares, que deram origem as Figuras 2 e 3, ainda precisam de refinamentos quando comparados aos resultados experimentais, pois ainda apresentam erros de quantidade de massa de determinadas amostras (Tabela 1).

Os valores das amplitudes que obtiveram valores menores ou maiores que o ideal no equipamento, 6000 mV para C e 4000 mV para N estão com os valores destacados (tabela 1)

Tabela 1: Resultados experimentais comparados com os valores teóricos calculados para C e N

Padrão	%	Carbono			%	Nitrogênio		
		Massa Teórica (µg)	Massa (µg)	Amplitude (mV)		Massa Teórica (µg)	Massa (µg)	Amplitude (mV)
Ureia	20,1	200-267	0,203	4635 ¹	46,68	150-200	0,203	3188 ¹
			0,291	6489			0,291	4542
Acetanilida	71,08	56-75	0,058	4642 ¹	10,33	678-904	0,596	2004 ¹
			0,102	7892 ²			0,698	2420 ¹
USGS 62	49,5	81-106	0,058	3402 ¹	28,8	244-325	0,405	3991
			0,109	6036			0,514	4936 ²

¹Valores de insaturação do equipamento na análise

²Valores de saturação do equipamento na análise

Fonte: Próprio autor

Os cálculos teóricos não condizem com o experimental, principalmente no caso da Acetanilida que para as análises de C e N a massa mínima não atingiu a amplitude necessária e a massa máxima saturou o equipamento.

Este fato pode ser devido a erros de cálculos tanto por o equipamento necessitar de uma massa de C e N diferentes da explicitada na nota técnica, ou, a erros devido a saturação do equipamento causado por amostras anteriores, alterando assim os intervalos de massas das amostras calculados e experimentais (Baczynski et al., 2023).

Os resultados dos cálculos das massas com as porcentagens de C e N foram construídos gráficos da Porcentagem vs. Massa, em escala logarítmica para obtenção de uma reta.

Figura 2: Massa vs. %Carbono

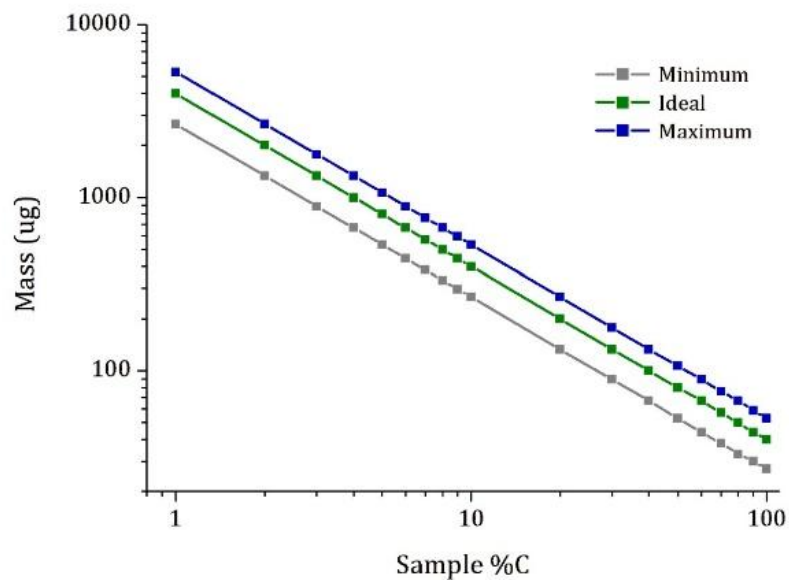
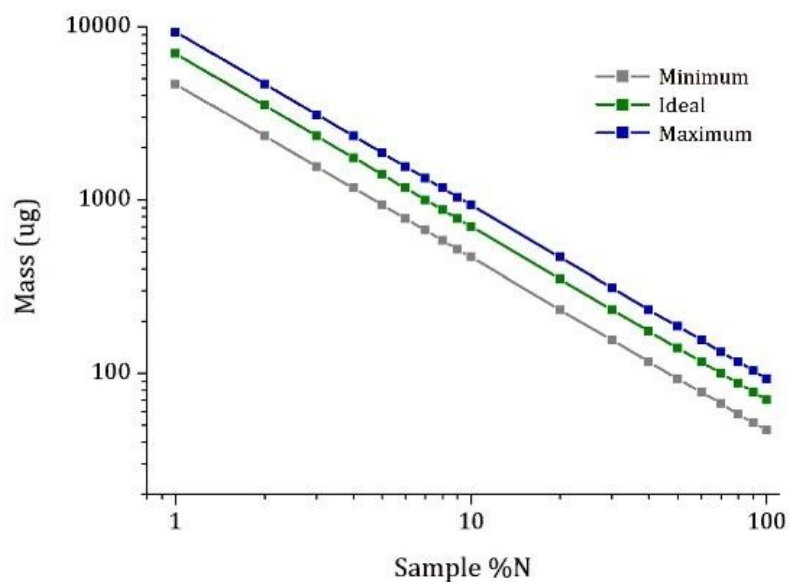


Figura 3: Massa vs. %Nitrogênio



Com os gráficos construídos (figuras 3 e 4) a %N e %C interfere na quantidade de massa a ser encapsulada da amostra. Dado que o excesso de

massa de uma amostra satura o equipamento de maneira a causar mais erros nas razões isotópicas (Yin et al., 2021).

Além disso, foram analisados $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, NT e COT em amostras de folhas para comparar os resultados da folha homogeneizada inteira (1, 2 e 3) com os seus segmentos ao longo de seu comprimento (tabela 2).

Tabela 2: Comparação de NT, COT, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no comprimento das folhas

Amostras	NT	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	COT	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
1	1,81	3,31	46,05	-25,66
1T	1,51	3,34	40,11	-26,57
1ME	1,83	3,02	41,65	-26,57
1MD	2,00	3,25	47,20	-26,28
1B	2,02	3,26	43,35	-26,42
2	1,56	0,04	46,81	-29,95
2T	1,89	1,44	47,29	-30,84
2ME	1,51	1,08	45,93	-30,90
2MD	1,86	1,30	49,01	-31,09
2B	1,77	1,43	47,77	-30,99
3	1,96	7,63	50,51	-30,69
3T	2,14	7,68	43,67	-31,20
3ME	2,47	7,58	47,29	-31,21
3MD	2,42	7,64	50,15	-31,14
3B	2,41	7,49	44,96	-30,89

O número dos códigos serve para indicar as folhas processadas inteiras (1, 2 e 3) e as secções (T: topo, ME: meio esquerdo, MD: meio direito, B: base).

Fonte: Próprio autor

Tabela 3: Variação da média dos valores de NT, COT, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no comprimento das folhas

Variação da média dos valores (‰)				
Amostra	NT	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	COT	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
1	0,09±0,19	0,28±0,58	7,71±16,16	5,51±7,05
2	0,19±0,12	1,27±0,12	0,69±0,89	1,00±0,08
3	0,40±0,11	0,03±0,06	3,99±2,20	0,42±0,11

Fonte: Próprio autor

Na análise dos resultados, em algumas secções das amostras tiveram valores bem próximos as da amostra inteira, como no caso dos pares 1 e 1ME, 2 e 2ME, 3ME, 3MD e 3B, para NT. Mas, vale ressaltar que a aproximação destes resultados não implica em uma hipótese de utilização apenas destas secções

como resultados, visto que tanto para as análises de COT, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, os valores das subdivisões comparadas as amostras inteiras apresentaram diferenças.

3.2 Processo 2

Teve como objetivo avaliar as condições de coleta e armazenamento das amostras ao longo do tempo de 0, 24, 48 e 72 horas, armazenadas em sacos plástico (A e B) e em sacos de papel (C).

As amostras com a identificação A0 e B0, foram coletadas e seguidas direto para o processo de secagem via estufa de convecção, não sendo colocadas em sacos plásticos. A amostra C0 não foi analisada, visto que tanto A0 como C0 apenas diferem do material em que são armazenadas, mas ambas com o tempo menor que 1 hora.

Além disso, também foram analisadas as condições de coleta das amostras, mergulhadas em nitrogênio por 8 segundos (B) e apenas armazenadas nos sacos (A e C), avaliando os valores de NT, $\delta^{15}\text{N}$, COT e $\delta^{13}\text{C}$ (tabela 4).

Tabela 4: Valores de NT, COT, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nos três diferentes métodos de coleta e armazenamento das amostras

Amostras	NT	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	COT	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
A0	1,71	2,48	31,75	-27,47
A24	2,69	9,13	34,13	-25,47
A48	3,27	9,00	37,13	-25,37
A72	2,58	5,93	34,13	-27,99
C24	1,99	6,15	34,92	-26,76
C48	2,67	5,14	31,65	-29,42
C72	2,35	7,78	34,95	-26,53
B0	2,10	7,95	35,45	-26,99
B24	2,45	8,66	34,91	-26,53
B48	2,15	7,35	34,82	-26,81
B72	1,95	5,18	36,43	-26,76

O número dos códigos usados para indicar os procedimentos (A: guardadas em sacos plásticos, B: mergulhadas em nitrogênio e armazenadas em sacos plásticos, C: armazenadas em sacos de papel) e o tempo de armazenamento antes da secagem (0: tempo menor que 1 hora, 24: 24 horas, 48: 48 horas e 72: 72 horas)

Fonte: Próprio autor

É possível identificar aumento nos valores de NT, para todos os tipos de tratamentos entre 0 e 48h após a coleta das amostras, com exceção das amostras pertencentes ao Grupo B, no qual houve aumento apenas entre 0 e 24 horas seguidas por uma diminuição.

Este tipo de aumento dos resultados de NT e $\delta^{15}\text{N}$ no período antes das amostras serem colocadas na estufa pode ser devido a ação de fungos decompositores, os quais mesmo não sendo visíveis ao dado momento, podem realizar o processo de decomposição da matéria orgânica, alterando os valores de NT, e, conseqüentemente $\delta^{15}\text{N}$ (Novak et al., 2019).

No mesmo tipo de análise, vale ressaltar que as amostras colocadas para secagem após 72h armazenadas (A72, B72 e C72) apresentaram redução dos seus valores de NT quando comparados ao aumento gradual ocorrido em 24 e 48h.

Na análise de $\delta^{15}\text{N}$ também houve aumentos nos valores isotópicos para os três tipos de tratamento entre 0 e 24h, mais evidente no método do Grupo A na qual A0 e A24 foi de aproximadamente 6,65‰.

Nas análises de COT e $\delta^{13}\text{C}$ os resultados das amostras não apresentaram um comportamento padronizado em aumento ou diminuição dos seus valores isotópicos.

A tabela 5 apresenta a variação das médias dos valores para as análises de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, NT e COT, pode-se verificar que os diferentes tipos de coleta e armazenamento das amostras causam grande influência em seus resultados isotópicos.

Tabela 5: Variação das médias dos valores de NT, COT, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nos diferentes métodos de coleta e armazenamento das folhas

Variação das médias dos métodos de tratamento				
Amostras	NT	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	COT	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
A	1,13±0,28	5,54±1,39	3,38±0,07	1,19±1,42
B	0,08±0,17	1,25±0,88	0,69±0,06	0,29±0,11
C	0,62±0,23	3,87±0,94	2,09±1,46	0,10±1,23

Fonte: Próprio autor

Além disso, outro objetivo do estudo deste processo é relacionar a absorção da umidade das amostras com características higroscópicas com a influência desta absorção com a variação nos resultados em NT e COT (tabela 6).

Tabela 6: Valores de NT, COT das amostras secas estufa e deixadas ao ambiente para absorver umidade

Amostras	Secas		Úmidas	
	NT	COT	NT	COT
USGS 61	28,40	48,30	28,08	48,24
	28,90	48,76	28,71	48,28
USGS62	28,45	48,76	28,08	47,73
	28,12	47,57	28,05	47,22

Fonte: Próprio autor

Com os resultados obtidos é possível identificar diferenças nos valores de NT e COT entre as amostras secas e úmidas de ambos os padrões. Essas diferenças se devem a presença de umidade nas amostras, influenciando nas massas, já que parte delas está composta por água, causando erros nas medidas, considerando que, ambas possuem relação direta com a massa encapsulada de forma que se a massa pesada não condiz com a quantidade real da massa da alíquota, as porcentagens não são confiáveis.

Em ambos os Procedimentos, 1 e 2, foi aplicado o teste One-Way ANOVA com $p < 0,05$, utilizando o software SigmaPlot 15.0, tal teste tem o princípio de variabilidade total dos dados entre grupos, calculando a razão entre essas variabilidades.

Nesse teste, assume-se que as variâncias entre os dois grupos são condizentes, caso esta condição não for atendida, principalmente se as variações forem muito diferentes o teste pode falhar, indicando que os dados dentro de cada grupo não seguem uma distribuição normal e são altamente assimétricos, ou, contém outliers extremos.

Na análise dos resultados houve a falha no teste One- Way ANOVA, pois, as diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado ao acaso, havendo uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), sendo necessária a aplicação de outro teste de

comparação múltipla, o Teste de Turkey, o qual verifica quais pares de médias são significativamente diferentes após a realização do teste ANOVA.

Com a utilização deste segundo teste, houve ainda uma diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,001$, tanto para os resultados das folhas, com a amostra moída inteira e seccionada, como para os testes dos diferentes processos de coleta e armazenamento e para os resultados dos padrões comparados secos e úmidos.

Com os procedimentos descritos neste trabalho é possível verificar a importância do cuidado no manuseio, preparação e armazenamento das amostras para a análise isotópica (MEINKOTH; ALLISON, 2007).

Com o Procedimento 1 é possível perceber que o uso correto da massa é essencial neste tipo de análise, afim se sensibilizar o equipamento corretamente diminuindo os erros nos resultados (BALINT et al., 2024), e ainda, verificado o processo de homogeneização da amostra garantindo resultados representativos da amostra a partir da alíquota pesada. O Procedimento 2 destacou a necessidade do processo de secagem da amostra logo após a coleta (CECCHETTI et al., 2020).

4 Conclusão

Dessa forma, a partir dos resultados apresentados foi possível concluir que o manuseio, secagem, armazenamento e quantidade de massa nos influenciam nos resultados de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, COT e NT durante os processos de preparação de amostras vegetais. Além disso, os resultados evidenciaram a influência da umidade nos valores de NT e COT, de maneira que realça o armazenamento e secagem das amostras durante os processos de preparação.

5 Referências

BACZYNSKI, A. A. et al. Sequential measurement of ^{13}C , ^{15}N , and ^{34}S isotopic composition on nanomolar quantities of carbon, nitrogen, and sulfur using nano-elemental analysis/isotope ratio mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 37, n. 5, 15 mar. 2023.

BALINT, S. et al. Experimental assessment of elemental analyzer isotope ratio mass spectrometry normalization methodologies for environmental stable isotopes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 38, n. 17, 15 set. 2024.

BETTEZ, N. D.; GROFFMAN, P. M. Nitrogen deposition in and near an urban ecosystem. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 11, p. 6047–6051, 4 jun. 2013.

BRENNA, J. T. et al. High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 16, n. 5, p. 227–258, 1997.

CAMPANELLI, G. et al. Innovative Tools for Nitrogen Fertilization Traceability in Organic Farming Products: A Cauliflower Case Study. **Horticulturae**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2024.

CANNELL, M. G. R.; THORNLEY, J. H. M. Temperature and CO_2 Responses of Leaf and Canopy Photosynthesis : a Clarification using the Non-rectangular Hyperbola Model of Photosynthesis. **Annals of Botany**, v. 82, p. 883–892, 1998.

CARTER, J. F.; FRY, B. **Ensuring the reliability of stable isotope ratio data - Beyond the principle of identical treatment. Analytical and Bioanalytical Chemistry**, mar. 2013.

CECCHETTI, A. R. et al. Use of stable nitrogen isotopes to track plant uptake of nitrogen in a nature-based treatment system. **Water Research X**, v. 9, 1 dez. 2020.

COBLEY, L. A. E.; PATAKI, D. E. Vehicle emissions and fertilizer impact the leaf chemistry of urban trees in Salt Lake Valley, UT. **Environmental Pollution**, v. 254, 1 nov. 2019.

DUNN, P. et al. **Isotope Ratio Mass Spectrometry**. 2. ed. [s.l: s.n.].

FIGUEIRA, R. et al. Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de caju. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 04, p. 317–324, 9 dez. 2011.

GEHRE, M.; STRAUCH, G. High-temperature elemental analysis and pyrolysis techniques for stable isotope analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 13, p. 1497–1503, 2003.

GIANNIOTI, Z. et al. **Isotope ratio mass spectrometry (IRMS) methods for distinguishing organic from conventional food products: A review. TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., , 1 jan. 2024.

GORDON, G. W. et al. Preservation of hair stable isotope signatures during freezing and law enforcement evidence packaging. **Forensic Chemistry**, v. 11, p. 108–119, 1 dez. 2018.

GREENWOOD, J. P. Hydrogen and D/H analysis of apatite by Elemental Analyzer-Chromium/High-Temperature Conversion-Isotope Ratio Mass Spectrometry (EA-Cr/HTC-IRMS). **Chemical Geology**, v. 500, p. 175–181, 15 nov. 2018.

KRACHT, O. **Comparison of Isotope Analysis with Single Reactor Combustion and Conventional Combustion in a Dual Reactor Setup.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.thermofisher.com/irms>.

LI, C. et al. **Recent advances in Chinese food authentication and origin verification using isotope ratio mass spectrometry. Food Chemistry** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2023.

LI, C. et al. Similarity recognition approach to identify zero-added MSG soy sauce using stable isotopes and amino acid profiles. **Food Chemistry**, v. 461, 15 dez. 2024.

LIU, S. et al. Integrated aggregate turnover and soil organic carbon sequestration using rare earth oxides and ^{13}C isotope as dual tracers. **Geoderma**, v. 430, 1 fev. 2023.

MEINKOTH, J. H.; ALLISON, R. W. **Sample Collection and Handling: Getting Accurate Results. Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, mar. 2007.

NIETNER, T. et al. Determination of geographical origin of distillers dried grains and solubles using isotope ratio mass spectrometry. **Food Research International**, v. 60, p. 146–153, 2014.

NOVAK, V. et al. Authenticity testing of organically grown vegetables by stable isotope ratio analysis of oxygen in plant-derived sulphate. **Food Chemistry**, v. 291, p. 59–67, 1 set. 2019.

PETINATI, B. E. DA S. et al. Padronização de metodologia de extração lipídica para análise isotópica de tecidos animais. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 16, p. 1, 2 out. 2018.

REAY, M. K. et al. LDPE and biodegradable PLA-PBAT plastics differentially affect plant-soil nitrogen partitioning and dynamics in a *Hordeum vulgare* mesocosm. **Journal of Hazardous Materials**, v. 447, 5 abr. 2023.

RHODES, C. N. et al. The use of stable carbon isotopes to authenticate claims that poultry have been corn-fed. **Food Chemistry**, v. 118, n. 4, p. 927–932, 15 fev. 2010.

SHIBUYA, E. K. et al. Sourcing Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, v. 160, n. 1, p. 35–43, 27 jun. 2006.

SILVERMAN, S. N. et al. **Practical considerations for amino acid isotope analysis. Organic Geochemistry** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2022.

SMITH, B. N.; EPSTEN, S. Two Categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios for Higher Plants. **Plant Physiol**, v. 47, p. 380–384, 1971.

SOUZA-KRULISKI, C. R. DE et al. A study of adulteration in Brazilian honeys by carbon isotope ratio. **Ciênc. agrotec**, v. 34, n. 2, p. 434–439, 2010.

SZPAK, P.; METCALFE, J. Z.; MACDONALD, R. A. Best practices for calibrating and reporting stable isotope measurements in archaeology. **Journal of Archaeological Science: Reports**, v. 13, p. 609–616, 1 jun. 2017.

THIENGO, C. C. et al. Nitrogen fertilization regulates crosstalk between marandu palisadegrass and *Herbaspirillum seropedicae*: An investigation based on ^{15}N isotopic analysis and root morphology. **Environmental Research**, v. 249, 15 maio 2024.

TORRES-COBOS, B. et al. Investigating isotopic markers for hazelnut geographical authentication: Promising variables and potential applications. **Food Chemistry**, v. 449, 15 ago. 2024.

WANG, N. et al. Influences of oxidation ability on precision in nitrogen isotope measurements of organic reference materials using elemental analysis-isotope ratio mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 35, n. 14, 31 jul. 2021.

XIE, L. et al. A study on the simultaneous determination of nitrogen content and ^{15}N isotope abundance in plants using peak height intensities at m/z 28 and 29. **Talanta**, v. 275, 1 ago. 2024.

YAMORI, W.; HIKOSAKA, K.; WAY, D. A. **Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: Temperature acclimation and temperature adaptation.** **Photosynthesis Research**, fev. 2014.

YIN, X.-J. et al. Determination of $\delta^{15}\text{N}$ on Microgram Amounts by Modified Element Analysis-Isotope Ratio Mass Spectrometry | 元素分析-同位素质谱联用测定微量氮元素同位素方法研究. **Journal of Chinese Mass Spectrometry Society**, v. 42, n. 3, p. 346–352, 2021.