

**UNESP - Universidade estadual paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

IBB - Instituto de Biociências de Botucatu

Nicholas M. C. Sene e Silva

**Espectrometria de Massa para análise
isotópica dos bio-elementos**

Botucatu – SP

2009

Nicholas M. C. Sene e Silva

Espectrometria de massa para análise isotópica
dos bio-elementos.

**Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista “Julio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Física
Médica.**

Orientador: Prof Dr. Carlos Ducatti

Botucatu - SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Sene e Silva, Nicholas M.C.

Espectrometria de massa para análise isotópica dos bio-elementos /
Nicholas M. C. Sene e Silva. - Botucatu [s.n], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Física médica) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Carlos Ducatti

1. Física médica 2. Isótopos estáveis

Palavras-chave: Espectrometria de massas; Isótopos estáveis; Método
Pirólítico

Dados do Trabalho de Conclusão de Curso constante no CD

Nome aluno:	Nicholas Michael Caesar Sene e Silva
Curso:	Física Médica
Título do trabalho:	Espectrometria de massa para análise dos bio-elementos
Orientador:	Prof Dr. Carlos Ducatti
Co-orientador:	-
Supervisor:	Prof Dr. Roberto Morato Fernandez
Depto onde foi realizado:	Centro de Isótopos Estáveis
Instituição:	UNESP – IBB – Botucatu
Conclusão (mm/aaaa):	11/2009

Dedicatória

*À duas pessoas importantes que partiram:
meu irmão Johannes e meu avô Jandiro.*

Descansem em PAZ !

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si, tornando possível a conclusão deste trabalho:

Primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, irmãos, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A Maria Clara, pela alegria que não me deixa desistir dos meus sonhos.

Ao professor e orientador Carlos Ducatti por seu apoio e paciência, que me levaram a execução e conclusão desta monografia.

A todos os professores do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP pela importante contribuição na minha formação acadêmica.

Aos amigos e colegas, em especial, Eduardo, Marcelo “Porpeta”, Rodrigo e grandes “irmãos” da República Bico do Corvo, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

A minha namorada, Jannine, pelo incentivo na reta final deste trabalho.

Aos amigos da turma III de Física Médica da UNESP Botucatu, pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos funcionários do Centro de Isótopos Estáveis – IBB pela contribuição na elaboração deste trabalho.

Resumo

A espectrometria de massa é uma técnica analítica bastante utilizada nas mais diversas áreas da pesquisa acadêmica. Permite o conhecimento das informações a respeito do “micro-mundo” dos átomos levando a consideráveis avanços na ciência de hoje. A análise dos isótopos estáveis do carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, também conhecidos como bio-elementos, mostra-se como uma das principais áreas de interesse no uso do método proposto. O desenvolvimento das técnicas e equipamentos acoplados ao espectrômetro de massa promete oferecer progressos cada vez maiores neste campo de atuação, em especial, para as ciências biológicas e áreas afins. O método pirolítico na redução de compostos orgânicos sob elevadas temperaturas proporciona a análise isotópica simultânea dos bio-elementos H e O, através dos gases liberados, H₂ e CO após o processo pirolítico, diminuindo significativamente o tempo de análise e a quantidade de material para amostra. Este trabalho apresenta uma revisão da espectrometria de massas com seus princípios básicos de funcionamento e do método pirolítico para a redução de compostos a temperaturas acima de 1400°C para análise isotópica dos bio-elementos.

Palavras-chave: Isótopos estáveis, espectrometria de massas, método pirolítico.

Abstract

Mass spectrometry is an analytical technique widely used in several areas of academic research. It allows the knowledge of the information about the "micro-world" of atoms leading to significant advances in science today. The analysis of stable isotopes of carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen and sulfur, also known as bio-elements, shows itself as a major area of interest in using the proposed method. The development of techniques and equipment coupled with mass spectrometry promises to deliver even greater progress in this field, in particular, for the biological sciences and related areas. The pyrolytic method in reduction of organic compounds at high temperatures provides simultaneous isotopic analysis of bio-elements H and O, by the gases released, H₂ and CO after the pyrolytic process, significantly reducing analysis time and the amount of material to sample. This paper presents a review of mass spectrometry with its basic principles of operation, and pyrolytic method for reducing compounds at temperatures above 1400 ° C for isotopic analysis of bio-elements.

Sumário

Dedicatória.....	I
Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Sumário.....	5
1. Introdução.....	6
1.1 <i>Isótopos Estáveis</i>	6
1.2 <i>Notação Delta</i>	7
1.3 <i>Padrões de referência (CHON'S)</i>	9
2. Espectrometria de Massas	10
2.1 <i>Histórico</i>	10
2.2 <i>Princípios Básicos</i>	12
3. <i>Espectrometria de Massa com Cromatografia Gasosa (GC-IRMS)</i>	19
3.1 <i>Método Piroclítico</i>	21
3.2 <i>Decomposição térmica sem adições – método offline</i>	24
3.3 <i>Pirólise com tubo vazio – método online</i>	24
3.4 <i>Métodos de redução usando carbono para análise isotópica do hidrogênio e oxigênio</i>	25
4. Referências Bibliográficas	32

1. Introdução

1.1 *Isótopos Estáveis*

Nos dias de hoje, a utilização dos isótopos radioativos na área médica e industrial mostra-se amplamente difundida e com técnicas bem desenvolvidas. No entanto, o uso deste grupo de isótopos deve sempre ser considerado e justificado, devido aos grandes riscos que a radiação ionizante produzida por tais elementos instáveis pode causar no Homem. Assim, foi possível o desenvolvimento de novas técnicas utilizando-se de isótopos estáveis, os quais não apresentam qualquer tipo de cuidados especiais no que diz respeito à nossa proteção.

A primeira metade do século XX permitiu grandes avanços nas áreas físico-químicas da ciência em geral. A segunda metade deste foi marcada pelo uso dos isótopos estáveis, principalmente, na área da Geoquímica. Hoje em dia, tem-se obtido grandes avanços em novos segmentos da pesquisa acadêmica, por exemplo, Ciências Atmosféricas, Biológicas e Agrárias.

O crescimento das pesquisas que fazem uso de isótopos estáveis deve-se ao desenvolvimento e modernização de técnicas analíticas, principalmente da espectrometria de massa, indispensável para as análises isotópicas e que permite excelente precisão nas medidas realizadas. Os avanços tecnológicos nos sistemas acoplados ao espectrômetro de massa também deve ser considerado no que diz respeito ao progresso desta área de estudo.

Qualquer átomo é composto de duas partes básicas: um núcleo de carga positiva composto por prótons e nêutrons (partículas elementares), onde se concentra a massa do átomo; e a eletrosfera, região carregada negativamente devido à presença de uma nuvem de elétrons (partículas elementares) que orbitam o núcleo, fornecendo as propriedades químicas do elemento. O átomo neutro é aquele que se apresenta com as cargas positivas dos prótons equilibradas com as cargas negativas dos elétrons, ou seja, o número de prótons (Z) é igual ao número de elétrons (e). O número de massa do átomo (A) é dado pela soma do número de prótons e número de nêutrons (N) presentes no núcleo, $A = Z + N$ em unidades de massa atômica (u.m.a.).

A teoria define isótopos como átomos que possuem o mesmo número atômico, ou seja, ocupam o mesmo local na tabela periódica, do grego *isos* igual e *topos* lugar, entretanto, possuem diferente número de massa devido ao diferente número de nêutrons. Pode-se também defini-los como átomos que possuem propriedades químicas semelhantes, conferidas à eletrosfera, porém com propriedades físicas diferentes, determinadas pelo núcleo do mesmo. Os isótopos existem em duas formas – estáveis ou radioativos. A nomenclatura de isótopos de um determinado elemento químico X descreve-se por A_ZX .

Hoje, tem-se conhecimento de mais de 2500 diferentes isótopos distribuídos entre os 115 elementos químicos da tabela periódica, sendo que destes, aproximadamente 260 são isótopos estáveis.

Os principais isótopos estáveis utilizados atualmente nas pesquisas acadêmicas restringem-se aos chamados bio-elementos: Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre (CHON'S), pois estes se encontram na estrutura molecular dos carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA) constituindo quase todas as formas de tecidos vivos. A tabela 1 apresenta os isótopos estáveis dos bio-elementos e suas respectivas porcentagens de ocorrência natural.

1.2 Notação Delta

A medida da razão do isótopo estável pesado em relação ao isótopo leve de um determinado elemento requer grande precisão. Para isto, McKinney et al. (1950) introduziu a notação delta, ou valor delta (δ), que fornece um significado muito conveniente para expressar a pequena diferença relativa na razão isotópica entre amostra e padrão mensurada por espectrometria de massa. Este valor está relacionado com a base das intensidades dos sinais de íons medidas no espectrômetro de massa de razão isotópica. Análises com espectrômetro de massa de gases puros, como H₂, possuem reprodutibilidade de $\pm 0,01\%$ ou ainda melhor. Excelente reprodutibilidade como esta não representa a precisão da análise individual de uma amostra natural, porque alguns erros são introduzidos durante a coleta e preparação química nos procedimentos empregados. O símbolo δ , refere-se

a letra minúscula do alfabeto grego, denominado delta, utilizado em muitas disciplinas para expressar diferença.

Tabela 1 – Porcentagem de ocorrência natural dos isótopos estáveis dos bio-elementos (CHON'S)

Elemento	Isótopo	Abundância (átomos %)
Hidrogênio	¹ H	99.985
	² H	0.015
Carbono	¹² C	98.89
	¹³ C	1.11
Nitrogênio	¹⁴ N	99.63
	¹⁵ N	0.37
Oxigênio	¹⁶ O	99.759
	¹⁷ O	0.037
	¹⁸ O	0.204
Enxofre	³² S	95.00
	³³ S	0.76
	³⁴ S	4.22

Fonte: KELLY, 2003.

A aceitação do uso da comparação entre amostra e referência tem sido de fundamental importância para IRMS desde sua introdução e definição formal ao longo dos últimos 50 anos.

O valor delta (δ) expressa-se pela equação (1),

$$\delta = \left(\frac{R_x - R_{std}}{R_{std}} \right) \times 1000 \quad (\text{eq. 1})$$

onde R é a razão da abundância do isótopo pesado em relação ao leve, x denota a amostra e std é a abreviação, do inglês standard, para padrão. Para os elementos mais utilizados na pesquisa com isótopos estáveis (CHON'S) o R expressa-se por ¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N, D/H, ¹⁸O/¹⁶O, ³⁴S/³²S.

O valor delta expressa-se em *per mil* (‰). Um valor positivo de delta significa que a razão da abundância do isótopo pesado em relação ao leve é maior na amostra do que no padrão, e com o valor negativo, tem-se o significado contrário.

Dada uma razão absoluta de um padrão de referência, a razão absoluta de uma amostra de qualquer material pode ser determinada ou conhecida com a mesma precisão que se conhece a razão absoluta para o padrão. Assim, a composição isotópica do oxigênio, por exemplo, expressa-se pelo símbolo $\delta^{18}\text{O}$, como a do carbono, $\delta^{13}\text{C}$ e assim por diante.

1.3 Padrões de referência (CHON'S)

Padrões são escolhidos por conveniência, e, é claro, são assumidos com o valor zero *per mil* na escala de valores delta de interesse. Um padrão isotópico ideal seria um material homogêneo, com razão isotópica próxima àquela da amostra sob investigação, disponível em grandes quantidades, de fácil distribuição e processado de maneira fácil e segura. Ao longo dos tempos, esse padrão ideal raramente foi obtido e, importantes materiais utilizados, ou são não-homogêneos ou então, não possuem disponibilidade para todo o sempre.

Existem quatro materiais isotópicos primários de referência para os bio-elementos leves, listados na tabela 2.

O padrão mais utilizado para o oxigênio e o hidrogênio é o *Standard Mean Ocean Water* (SMOW), definido por Craig (1961). Para o carbono e oxigênio, o padrão mais comum é relacionado ao "PDB" *Cretaceous carbonate fossil Bellefleur* americana da formação Peedee da Carolina do Sul/EUA (Craig, 1957). Para o nitrogênio, o padrão aceito é o ar atmosférico e por fim, adota-se como padrão isotópico para o enxofre o mineral troilita do meteorito *Cañon Diablo*, CDT.

Tabela 2 – Tabela com os materiais utilizados como referência para medidas da composição isotópica dos bio-elementos

Material de Referência Primário	Razão Isotópica	valores aceitáveis ($\times 10^6$ ppm)
Standard Mean Ocean Water (SMOW)	$^2\text{H}/^1\text{H}$	155.76 ± 0.10
	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	2005.20 ± 0.43
	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	373 ± 15
Pee Dee Belemnite (PDB)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	11237 ± 9
	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	2067.1 ± 2.1
	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	379 ± 15
Ar	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	3676.5 ± 8.1
Cañon Diabolo Troilite (CDT)	$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	45004.5
	$^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$	8100.0

Fonte: KELLY, 2003.

2. Espectrometria de Massas

2.1 Histórico

Os espectrômetros de massa, em geral são usados para fazer uma avaliação do conteúdo atômico e molecular de uma dada amostra. Desde o início de seu desenvolvimento, em 1910 por J.J. Thomson (apud BRAND, 2004) no laboratório de Cavendish, em Cambridge, tem se mostrado como uma ferramenta técnico-analítica das mais importantes disponíveis para os cientistas, pois é capaz de fornecer importantes informações a respeito do microscópico mundo dos átomos, moléculas e íons, tais como, a composição elementar da amostra, estrutura molecular e a composição quantitativa e qualitativa de misturas complexas.

Uma das primeiras descobertas de Thomson com o advento desta técnica foi a existência dos isótopos estáveis, que foram detectados em 1912 na análise do gás neônio introduzido em um tubo de raios catódicos (massas 20 e 22, com respectivas abundâncias de 91% e 9%).

Continuando na mesma linha de estudos, Francis Willian Aston (apud BRAND, 2004), no mesmo laboratório, construiu um novo instrumento, utilizando de sistemas de vácuo mais eficientes, com um sistema coletor de íons otimizado e um

mecanismo de focalização do feixe iônico, o qual ele chamou de espectrógrafo de massa, utilizado para confirmar a existência dos isótopos estáveis, através da detecção por chapa fotográfica, para quase todos os elementos conhecidos até então. Aston descobriu 212 dos isótopos que ocorrem naturalmente, mediu a massa atômica dos isótopos com precisão de 0,1% e determinou sua abundância isotópica, provocando significativas alterações na tabela periódica. Devido a essas enormes contribuições para a Ciência, Thomson e Aston foram premiados com o Nobel de Física de 1906, e Química em 1922, respectivamente.

Concomitantemente, Arthur Jeffrey Dempster (Universidade de Chicago, EUA) (apud OLIVEIRA, 2006) se empenhava na determinação da abundância dos isótopos, por exemplo, Mg e K em 1920 e Pt e Ir em 1935, utilizando-se de um espectrômetro que focalizava a energia, enquanto que o instrumental de Aston, focalizava a velocidade dos íons formados.

Em 1929, Dempster desenvolveu o primeiro aparelho com dupla focalização dos íons, que permitia alto poder de separação. O instrumento consistia no uso de dois analisadores: um eletrostático de 90° e outro magnético de 180°.

Nos anos seguintes, o princípio da dupla focalização foi trabalhado e melhor desenvolvido por Brainbridge e Jordan em 1936. Neste mesmo ano, Mattauch e Herzog acoplaram um sistema óptico, permitindo a obtenção de um foco perfeito sobre a chapa fotográfica do detector. (apud OLIVEIRA, 2006).

Alfred Otto Carl Nier (Universidade de Minnesota, EUA), nos anos 40, propôs a utilização de um dispositivo elétrico para que se eliminassem os erros sistemáticos obtidos. Em 1947, Nier também propôs o uso de um mecanismo com duplo coletores de íons para medição simultânea de duas correntes iônicas, aumentando consideravelmente a precisão das medidas de razões isotópicas realizadas, eliminando completamente flutuações na corrente iônica devido à variações na temperatura, instabilidade do feixe etc. (apud OLIVEIRA, 2006).

Em 1950, McKinney aplicou o princípio da válvula de troca (*changeover valve*) na medida de razões isotópicas. Tal desenvolvimento permitiu a medida dos isótopos do oxigênio no gás O₂ e do oxigênio e carbono no CO₂ com elevada precisão.

Outro cientista merecedor de destaque foi Wolfgang (apud OLIVEIRA, 2006), agraciado com o prêmio Nobel em 1989, que propôs um analisador quadrupolo. Espectrômetros de massa com esse acessório possuem alta sensibilidade e rapidez, porém perdem na resolução e sensibilidade de abundância em comparação com os aparelhos que utilizam analisador magnético.

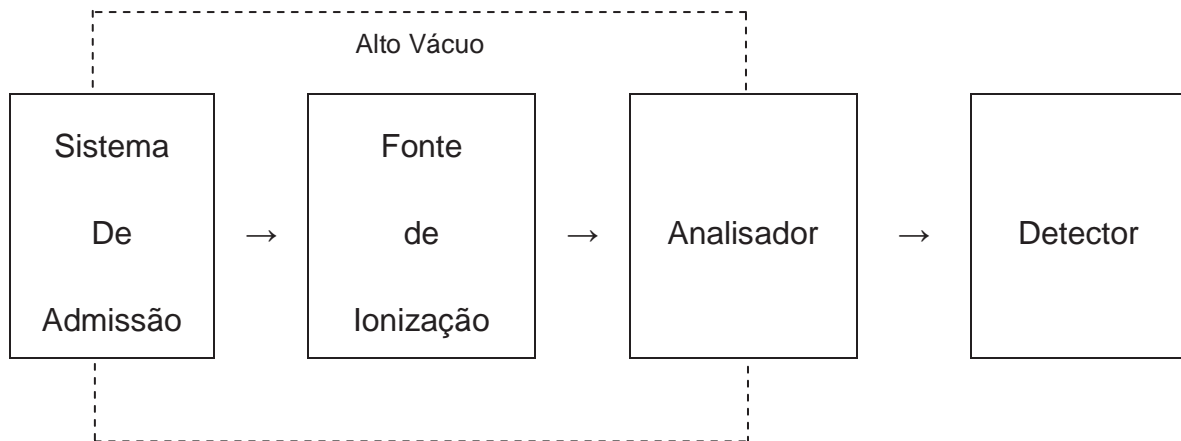
Hoje em dia, os modelos de espectrômetros de massa de alta resolução contam com um sistema de separação de íons constituído de um analisador eletrostático de 90° e um analisador magnético de 60° , conhecido como “sistema óptico Nier-Johnson”, criadores do projeto.

2.2 Princípios Básicos

A evolução dos equipamentos associados ao espectrômetro diminuiu significativamente os erros associados aos componentes eletrônicos e outros fatores. As válvulas de troca, com mecanismo de troca rápida entre amostra e padrão, permitem que as razões isotópicas de ambos sejam medidas sob as mesmas circunstâncias e condições quase idênticas. Nos primeiros espectrômetros, pistões de mercúrio eram operados manualmente para o ajuste da pressão do gás no sistema de entrada, assegurando que as pressões da amostra e do padrão fossem iguais.

No campo dos bio-elementos, a grande maioria dos equipamentos de análise isotópica refere-se aos equipamentos de baixa resolução, conhecidos como espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS).

Um espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS) consiste basicamente de um sistema de entrada, uma fonte de íons, um analisador elementar para a separação iônica e um detector de íons. O sistema de entrada é concebido para introduzir gases puros. O preparo destes gases pode ser on-line ou off-line. Moléculas neutras do sistema de entrada são introduzidas na fonte de íons, onde são ionizadas por impacto eletrônico e aceleradas e, então, são separadas por um campo magnético e detectadas por copos de Faraday, posicionados ao longo do detector do espectrômetro (Nier, 1940). O diagrama de blocos na figura 1 ilustra os componentes básicos de um espectrômetro de massa.



Fonte: DUCATTI, 2007.

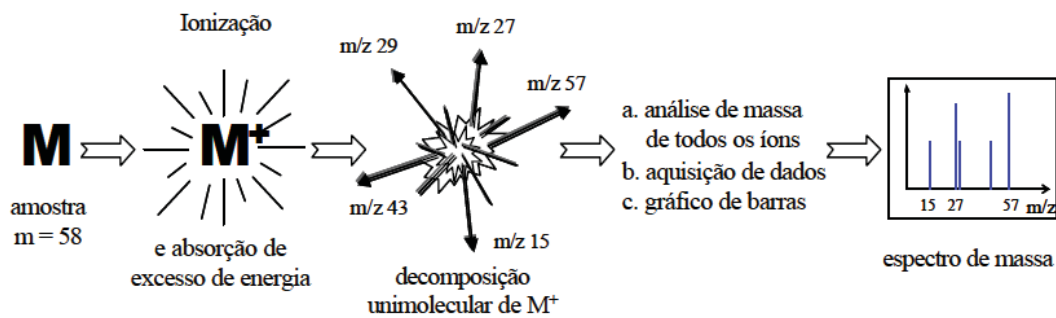
Figura 1 - Diagrama esquemático dos principais componentes do espectrômetro de massa de razão isotópica.

Para a obtenção uma análise da razão isotópica de um elemento é necessário ter conhecimento de duas características de entrada: a massa atômica do elemento analisado e sua abundância isotópica absoluta. O requisito básico para o método é a formação de íons livres na fase gasosa. Um esquema resumido do processo de uma análise por espectrometria de massa pode ser visualizado na figura 2, onde M representa uma molécula de um determinado composto gasoso, que após sofrer ionização se decompõe em íons de massas menores detectáveis gerando o espectro de massa.

O sistema de admissão nos espectrômetros de massa de dupla admissão (DI-IRMS) é composto de válvulas, tubos, capilares, conectores e medidores. Compreende dois reservatórios para diferentes gases. Um volume é utilizado para armazenar o gás padrão de referência, com composição isotópica conhecida. O outro volume comporta o gás que se deseja analisar. As válvulas de troca representam o principal componente do sistema. Elas permitem a rápida e alternada troca na entrada de uma dada amostra gasosa analisada com um padrão, fazendo a comparação rápida e repetida entre os gases, fornecendo a diferença de abundância isotópica entre eles expressa pelos valores delta.

A amostra gasosa é introduzida na fonte através de um capilar, cujas funções são de reduzir a quantidade de gás que entra na fonte e garantir o fluxo viscoso devido à elevada pressão de admissão. Essa condição de fluxo viscoso, necessária

para que uma amostra possa ser analisada em um sistema duplo de admissão, é facilmente obtida com o uso de capilares com comprimento adequado com a devida pressão calculada para aquele comprimento. O fluxo viscoso faz com que não ocorra o fracionamento isotópico na saída do gás dos capilares em direção a fonte de íons do espectrômetro.



Fonte: PONCIANO, 1996.

Figura 2 – Diagrama esquemático do processo de análise por espectrometria de massas.

Essas moléculas sofrem ionização devido ao impacto com os elétrons gerados por um filamento aquecido constituído de tungstênio, em geral. Nesta interação, das moléculas do gás com os elétrons energizados, tem-se a retirada de um elétron da camada de valência da molécula, de acordo com a equação (2):



A eficiência deste processo normalmente é muito baixa ($\sim 0,01\%$), sendo que maioria das moléculas que entram na fonte de íons é removida pelo alto-vácuo. Essa característica determina a sensibilidade do espectrômetro de massa, e depende da seção transversal de ionização, do número de elétrons e do número de moléculas presente na amostra.

A energia cinética adquirida pelas partículas na fonte de ionização devido à diferença de potencial entre as placas expressa-se pela equação (3)

$$qU = \frac{mv^2}{2} \quad (\text{eq. 3})$$

onde, v = velocidade da partícula, U = energia potencial e m = massa da partícula.

Após a ionização das moléculas gasosas, os cátions formados podem fragmentar-se em diversos pedaços de acordo com a energia interna que o íon adquiriu durante o processo de ionização. Estes são acelerados e colimados por um sistema de eletrodos que podem ter diferentes valores de energia potencial aplicada. Nesse estágio, o feixe iônico é resolvido, entrando numa região do tubo de vôo com um forte campo magnético e/ou elétrico aplicado. Esse campo gerado desvia o íon em trajetórias circulares, de acordo com a Força de Lorentz (equação 4):

$$|\vec{F}| = q\vec{E} + q\vec{v} \times \vec{B} \quad (\text{eq. 4})$$

onde B é o campo magnético aplicado e E o campo elétrico. O setor magnético pode ser comparado a um prisma óptico. Íons monoenergéticos de diferentes massas são dispersos ao longo do setor. Íons leves seguem uma trajetória com raio pequeno, enquanto os mais pesados apresentam trajetórias com raio maior.

Podem-se ter diferentes condições de focalização de acordo com a configuração dos instrumentos utilizados.

Focalização pela velocidade.

Nesta configuração, o campo elétrico (E) e o campo magnético (B) podem ser ajustados de modo que não ocorra deflexão do feixe do íon ao atravessar a região dos campos (Figura 3a). Deste modo, a força resultante será zero ($F=0$), e a equação (4) torna-se:

$$v = \frac{E}{B} \quad (\text{eq. 5})$$

ou seja, somente íons com velocidade E/B passam pelo sistema sem deflexão. A focalização pela velocidade pode ser usada ao longo do caminho do íon para a remoção de íons indesejáveis.

Focalização pela energia

Em alguns instrumentos o analisador apresenta configuração encurvada, na qual as placas elétricas carregadas separam os íons de acordo com a sua energia. O raio da curvatura dos íons pode ser obtido pela equação da força eletrostática $q \cdot E$, com a da força centrípeta mv^2/r , de modo que o movimento circular dos íons pode ser obtido por:

$$r = \frac{mv^2}{eE} \quad (\text{eq. 6})$$

Conseqüentemente o raio é diretamente proporcional a energia cinética clássica $mv^2/2$, conhecido como focalização pela energia (Figura 3b).

Em particular, somente os íons que possuem energia cinética igual $qEr/2$ podem movimentar-se através da trajetória de raio r , os demais íons sofrem colisões com a parede.

Focalização pelo momento

A maioria dos instrumentos emprega um simples analisador magnético (B) para separar os diversos feixes iônicos, correspondente aos diferentes feixes isotópicos (Figura 3c).

As partículas carregadas, ao se movimentarem através do campo magnético, sofrem a ação da força magnética $qv \times B$ (equação 4), responsável pela força centrípeta mv^2/r . Pela ortogonalidade do campo B, os íons sofrem trajetória de raio r , expressa por:

$$r = \frac{mv}{qB} \quad (\text{eq. 7})$$

Assim procedendo, cria a condição de focalização pelo momento (mv), ou seja, partículas com a mesma carga q e mesmo momento movem-se com o mesmo raio de curvatura, enquanto que os demais com diferentes valores definem diferentes trajetórias. Torna-se comum utilizar a equação (3), que expressa à

diferença de potencial V aplicada, e o campo magnético utilizado (B) para obter a relação massa/carga, através de:

$$r = \sqrt{\frac{2Vm}{B^2q}} \quad (\text{eq. 8})$$

Dessa forma, o íon isotópico de maior massa apresenta maior raio de deflexão.

Toda essa Física abordada está aplicada no chamado Analisador de massas. Este sistema resolve (separa) os íons oriundos da fonte de ionização de acordo com a relação massa/carga, ou seja, o feixe iônico principal é aberto em feixes dos íons isotópicos característicos.

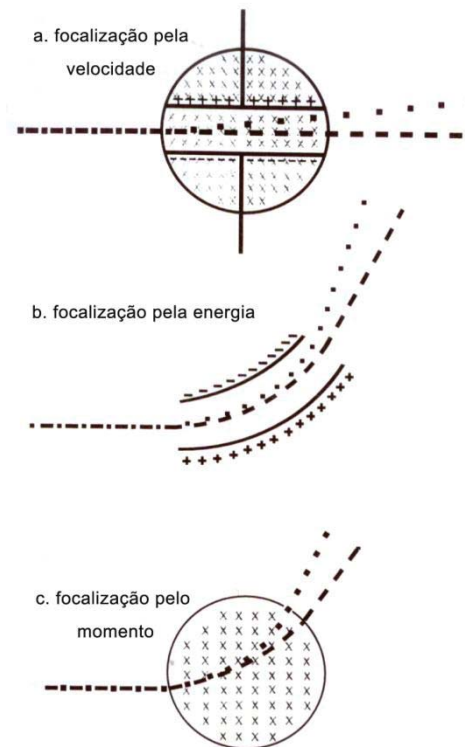
As três principais características do analisador são: limite de massa, a transmissão iônica e o poder de resolução em massa. O limite de massa significa o valor mais alto de massa que pode ser medido, geralmente expresso em daltons (Da) para um íon de carga unitária. A transmissão é a razão entre o número de íons que chegam ao detector e os íons produzidos na fonte. O poder de resolução é a capacidade de produzir dois sinais distintos para dois íons com uma diferença de massa pequena; pode ser quantificado por $R = m/\Delta m$ onde Δm é a menor diferença de massa capaz de ser resolvida, ou ainda, a largura de um pico a meia-altura. O analisador deve permitir a passagem de um número de íons suficiente para fornecer uma corrente de íons facilmente mensurável.

O feixe iônico, agora resolvido (aberto), segue ao longo do tubo de vôo em direção ao sistema coletor. O coletor quantifica o feixe iônico pela detecção e medição de pequenas correntes geradas. Esse processo pode envolver um ou diferentes tipos de coletores, tais como os copos de Faraday e multiplicadores eletrônicos.

Os copos de Faraday minimizam os erros de detecção provindos das correntes geradas por elétrons secundários. Os espectrômetros modernos possuem no mínimo três coletores Faraday.

A medida acurada da energia depositada pelo feixe de íons é obtida através de uma corrente elétrica que passa por resistores com resistência dependente da

intensidade relativa do feixe. A tensão aplicada nos resistores é amplificada e os sinais obtidos são convertidos para uma saída digital para então serem registrados. O resultado geral é estável e esses feixes bem definidos são utilizados para medida precisa da abundância relativa dos isótopos.



Fonte: CRISS, 1999.

Figura 3 - Condições de focalizações para a separação das massas dos feixes de íons dos isótopos pesados (traço) e leves (ponto). Campos elétricos (E) são designados pelas placas dos metais carregados (linhas com cargas positivas (+) e negativas (-)) e paralelos à página. Campos magnéticos (B) designados pela letra x são orientados perpendicularmente à página (penetrando).

A qualidade da análise depende da capacidade do espectrômetro de detectar todos os componentes presentes nesta amostra com a mesma sensibilidade, independentemente da complexidade e natureza química do material analisado. Este seria um espectrômetro de massas ideal, no entanto, não é possível. Para que as medidas realizadas sejam confiáveis, deve ser feita a preparação das amostras, manipulando-as para que se tornem algo que possa ser separado e detectado. No

caso da espectrometria de massas, a capacidade em quantificar o conteúdo de uma dada amostra é facilitada se a complexidade desta é reduzida através de métodos de separação dos componentes químicos antes da realização das medidas. Essa necessidade promoveu o uso e aperfeiçoamento das técnicas de separação, a cromatografia e pirólise, por exemplo, combinadas com a espectrometria, que tem sido utilizada para a determinação da razão isotópica dos bio-elementos (Brand, 1996) juntamente com os métodos de análise de razões isotópicas mais comuns pela comparação, bastante precisa, com gases puros nos sistemas de dupla entrada.

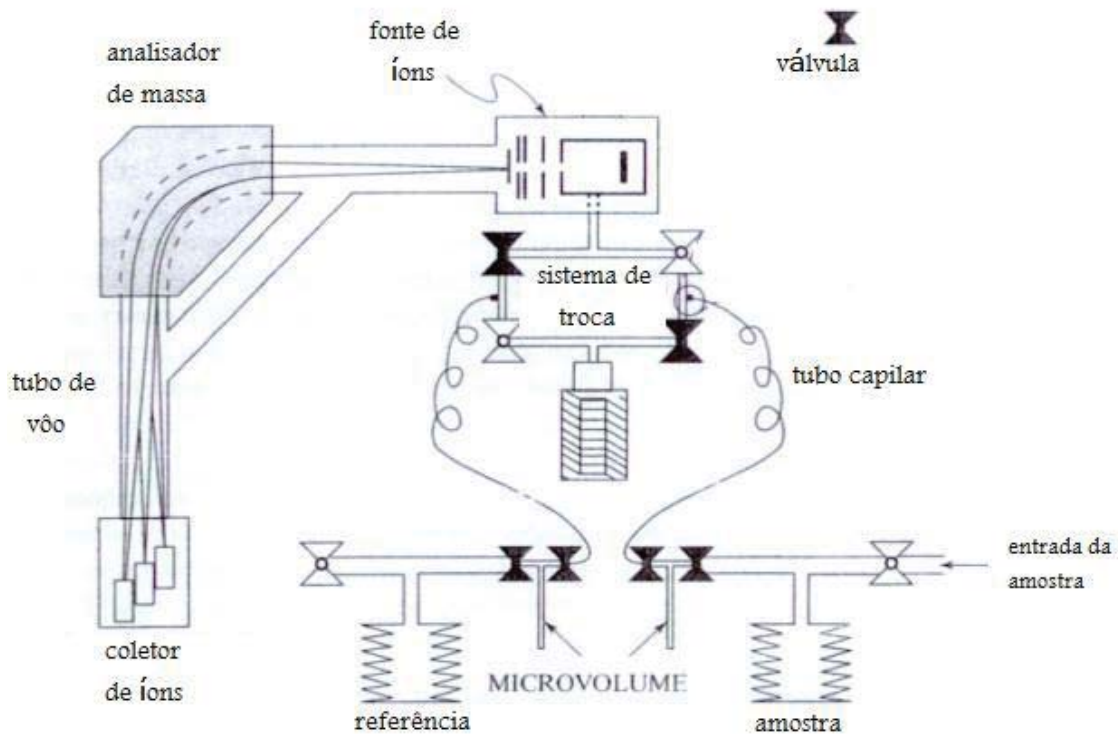
Os espectrômetros de massa modernos diferem das “velhas” máquinas principalmente no sistema de admissão, na sensibilidade da fonte, no uso de coletores múltiplos, na maior estabilidade e respostas rápidas dos componentes eletrônicos. O ajuste das pressões é feito automaticamente. A figura 4 representa um esquema detalhado de um típico espectrômetro de massa moderno.

3. *Espectrometria de Massa com Cromatografia Gasosa (GC-IRMS)*

Nos últimos anos, o método de fluxo contínuo na introdução do gás revolucionou a espectrometria de massa de razão isotópica abrindo diversos caminhos para a pesquisa científica. (Mathews e Hayes, 1978). No lugar da análise do gás por meio dos recursos oferecidos pelos sistemas de dupla admissão (DI-IRMS), as amostras agora são carregadas por uma corrente de gás hélio, purificadas por cromatografia gasosa e introduzidas diretamente na fonte de ionização do espectrômetro de massa. As primeiras aplicações online foram com a combustão à elevada temperatura de amostras pequenas para as análises de carbono e/ou nitrogênio. A tecnologia da GC-IRMS tem sido modificada para que seja possível substituir os métodos tradicionais de extração para quase todos os materiais analisados convencionalmente. O método traz vantagens, como a fácil e eficiente purificação do gás, rapidez na análise e utilização de amostra cada vez menores.

Os gases mais comuns introduzidos no IRMS com as respectivas massas dos isótopos medidos são dados na tabela 3.

As medidas de razões isotópicas do Hidrogênio são quase sempre feitas pela determinação da relação 3/2 da razão de H_2 , embora outros gases, incluindo a H_2O , têm sido utilizados com limitado sucesso.



Fonte: Adaptado de SHARP, 2007.

Figura 4 – Figura que ilustra os principais componentes do espectrômetro de massas.

Para o carbono, determina-se a razão isotópica pela razão 45/44 do gás carbônico. Das razões 29/28 e 30/28 do N_2 , obtém-se a razão isotópica para o nitrogênio.

Na medida da razão isotópica do oxigênio é mais comum a determinação através das razões de 46/44 do CO_2 , porém tem-se utilizado o uso do CO e O_2 . As razões de $^{18}O/^{16}O$ são determinadas pela razão 30/28 do CO e 34/32 do O_2 , enquanto $^{17}O/^{16}O$ é determinada pela razão 33/32 do O_2 .

Tabela 3 – Massa dos isótopos medidos em um sistema IRMS na análise de amostras gasosas mais comuns

Elemento	Gás	Massas dos isótopos medidos
Hidrogênio	H ₂	2 e 3
Carbono	CO ₂	44, 45 e 46
Nitrogênio	N ₂	28, 29 e 30
	CO ₂	44, 45 e 46
Oxigênio	O ₂	32, 33 e 34
	CO	28 e 30
Enxofre	SO ₂	64 e 66
	SF ₆	146, 147, 148 e 150

Fonte: SHARP, 2007.

3.1 Método Pirolítico

A combinação de técnicas de preparação online ou fluxo contínuo com IRMS (CF-IRMS), início e desenvolvimento, foi profundamente revisada por Midwood e McGraw (1999). O trabalho de Preston e Owens (1983), um sistema de analisador elementar acoplado com o espectrômetro de massa de razão isotópica, foi um dos primeiros a contornar a utilização dos instrumentos de dupla admissão. Do mesmo modo que os instrumentos DI-IRMS, CF-IRMS também necessita de amostras de gás puro.

A técnica de fluxo contínuo, embasada em dois instrumentos principais – o analisador elementar e a interface combustão-cromatografia gasosa, levou os métodos de preparação de amostras online a uma considerável evolução na determinação da razão isotópica do Hidrogênio e Oxigênio. Sob as condições de fluxo contínuo, o gás produzido da amostra é passageiro, e uma coluna gasosa de hélio em excesso, que atua como carreador, fornece as condições necessárias para o fluxo viscoso. Nos instrumentos convencionais de espectrometria de massa, o feixe iônico relativo ao gás hélio de m/z 3 provoca um “transbordamento” nos coletores, dificultando a medida da razão D/H. Para esta análise pelo método de fluxo contínuo, foram necessários avanços na construção dos equipamentos de IRMS.

Os avanços instrumentais foram acompanhados igualmente pelo desenvolvimento nos dispositivos periféricos acoplados ao espectrômetro de massa

para produção, online, de hidrogênio gasoso a partir da água e amostras orgânicas. Desde 1997, o método pirolítico vem sendo apresentado para fornecer recursos mais confiáveis na produção de H₂ a partir do volume da amostra e de compostos específicos.

A pirólise é definida como o aquecimento de um material que se decompõe em outros componentes sem a adição de um agente oxidante ou redutor. Um catalisador pode ser utilizado para diminuir a temperatura e o tempo da reação. Pode ser aplicada em água, compostos orgânicos, e também em compostos inorgânicos, nos três estados possíveis da matéria: sólido, líquido e gasoso.

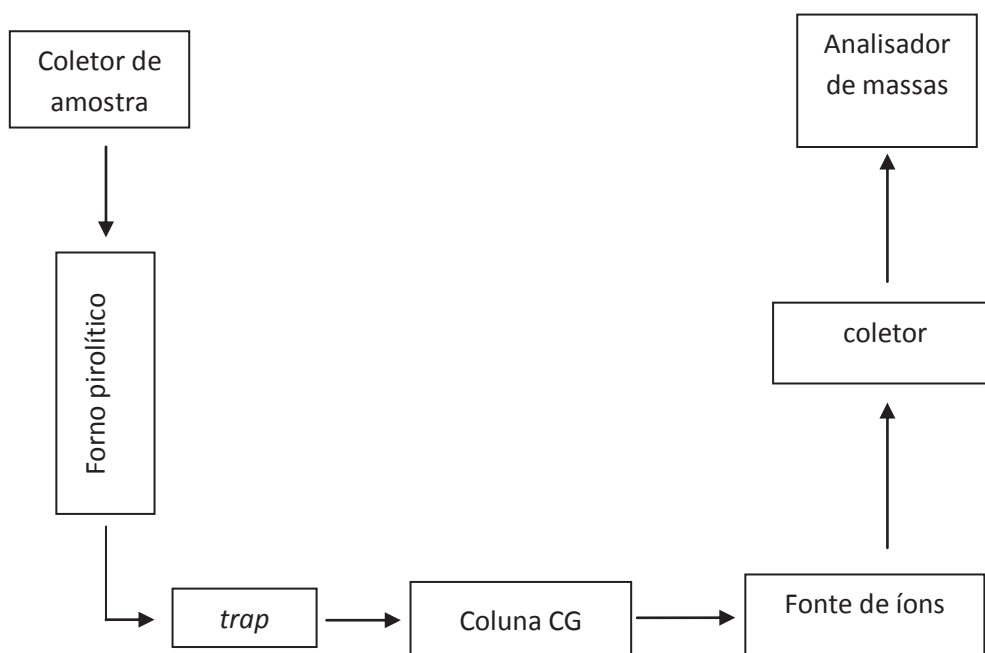
O método pirolítico acoplado ao sistema de GC-IRMS possui origens na configuração de espectrômetros descritos por Tobias e Brenna (1997), na qual um tubo vazio, constituído de alumina, mantido a uma temperatura de 1150°C, foi usado para converter hidrocarbonetos leves em H₂ gasoso. Burgoyne e Hayes (1998), improvisaram um sistema para conversão de alcanos de baixo peso molecular e alcoóis, separados em uma coluna de cromatografia gasosa, em hidrogênio, utilizando um reator pirolítico feito com tubo de alumina grafitada aquecida a 1430°C.

O desejo de se obter o valor delta para um determinado volume de deutério e oxigênio simultaneamente por CF-IRMS, resultou no desenvolvimento da interface pirolítica baseada nos analisadores elementar. Esses sistemas, Py/CF-IRMS, usam material inerte para o revestimento dos tubos onde ocorre a pirólise, como o carbono vitrificado, para a decomposição térmica (temperaturas acima de 1000°C) da amostra em H₂.

O uso de um analisador elementar, construído especialmente para elevadas temperaturas, acoplado ao sistema CF-IRMS foi proposto por Kornexl et al. (1999). O sistema obteve a conversão quantitativa de amostras de água, carbonetos e compostos orgânicos para medição de monóxido de carbono a 1400°C sobre uma pequena quantidade de carbono niquelizado. A eficiência do método foi comprovada com a análise de uma gama de materiais de referência da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) com uma precisão interna de 0,5‰. Ademais, o sistema pôde ser utilizado para determinação dos valores $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ e $\delta^{18}\text{O}\text{‰}$ em uma mesma

amostra de compostos nitrogenados. O sistema de um analisador elementar (AE) para o método pirolítico ilustra-se na figura 5.

Outros instrumentos básicos para o método pirolítico são: sistema de gás carreador, uma coluna de cromatografia gasosa e o *trap* para remoção de produtos indesejáveis na análise. Os sistemas permitem admissão de duas amostras (dupla entrada). Um coletor automático pode ser acoplado diretamente no reator para medidas de amostras sólidas. Do mesmo modo, um sistema injetor de amostras líquidas ou gasosas pode ser conectado ao instrumento. O design do tubo de reação depende da quantidade e do tipo de amostra a ser analisada. O reator consiste de um tubo de cerâmica revestido internamente por carbono vitrificado. Um ponto importante a ser observado na construção dos tubos de reação, é o vão existente entre as paredes interna e externa. O espaço tem a função de evitar a reação entre o carbono vitrificado e o oxigênio da alumina existente na cerâmica, o que resultaria em um incremento de fundo na medida de CO. Em geral, o espaço é preenchido por gás hélio.



Fonte: Adaptado de GEHRE, 2004.

Figura 5 – Diagrama de blocos representando o sistema de um analisador elementar construído especificamente para análises isotópicas via método pirolítico.

3.2 Decomposição térmica sem adições – método offline

O método de decomposição térmica de compostos orgânicos contendo somente carbono e hidrogênio foi descrito por Sofer e Schiefelbein et al. (1986).

O tubo de reação e os capilares eram aquecidos a 800-900°C por 1 hora para a remoção de contaminantes orgânicos e de água. O capilar era preenchido com uma amostra de 4 a 10mg. A amostra era colocada no tubo de reação selado em alto vácuo. Os tubos de reação eram colocados sobre uma prateleira em um forno a uma temperatura de 1140°C por um período de 30 minutos a 6 horas e meia, dependendo da qualidade da amostra. Quando a prateleira era retirada do forno, os tubos eram resfriados o mais rápido possível com ar frio, para que qualquer troca na reação fosse eliminada. No sistema de vácuo do espectrômetro de massa, o tubo era quebrado e a composição isotópica do hidrogênio era medida.

3.3 Pirólise com tubo vazio – método online

O método de pirólise online foi desenvolvido simultaneamente em 1997 por dois diferentes grupos de pesquisa: John Hayes, Tom Burgoyne e Arndt Schimmelmann na Universidade de Indiana e Ian Begley e Charles Scrimgeour no *Scottish Crop Research Institute*.

Em 1999, Hilkert *et al.*, apresentou o método de pirólise a altas temperaturas em tubo de reação vazio. Os gases efluentes da coluna de cromatografia foram pirolisados a uma temperatura máxima de 1500°C. O H₂ gasoso foi liberado via corrente de gás hélio para dentro do espectrômetro de massa de razão isotópica.

No mesmo ano, um método similar foi proposto por Scrimgeour. Ele descreveu o uso de um tubo de alumina (Al₂O₃) vazio aquecido a 1200±5°C. As amostras foram introduzidas via seringa em um injetor que possuía uma fenda fechada por 0,3 minutos seguido de uma purgada de gás hélio a uma taxa de 50mL/min). A corrente de hélio carreava a amostra para a coluna de cromatografia e os compostos separados eram pirolisados no tubo vazio, obtendo como resultados H₂, CO, carbono elementar e uma pequena quantidade de CH₄. A água era retirada através de um *trap* químico.

A medida isotópica de H na amostra de um hidrocarboneto é, em geral, maior que o necessário para o C. Isso se deve à menor eficiência da ionização do hidrogênio comparado com o carbono e também, à menor abundância natural do D comparado com ^{13}C .

3.4 Métodos de redução usando carbono para análise isotópica do hidrogênio e oxigênio

Redução no carbono niquelizado

A técnica foi apresentada por Micromass (Fourel et al., 1998) para a redução de amostras orgânicas em um analisador elementar (AE) (Carlo Erba NA 1500 – 1050°C) recoberto com carbono niquelizado, misturado com cristais de quartzo em um sistema de fluxo contínuo, conectado diretamente ao espectrômetro de massa para medidas simultâneas da composição isotópica de H e O em uma mesma amostra, como observa-se na figura 6.

H_2 e CO são os gases liberados na técnica e que após a separação na coluna de cromatografia são medidos no espectrômetro. A água foi retirada através de um *trap* de MgClO_3 . O gás hélio age como o carreador.

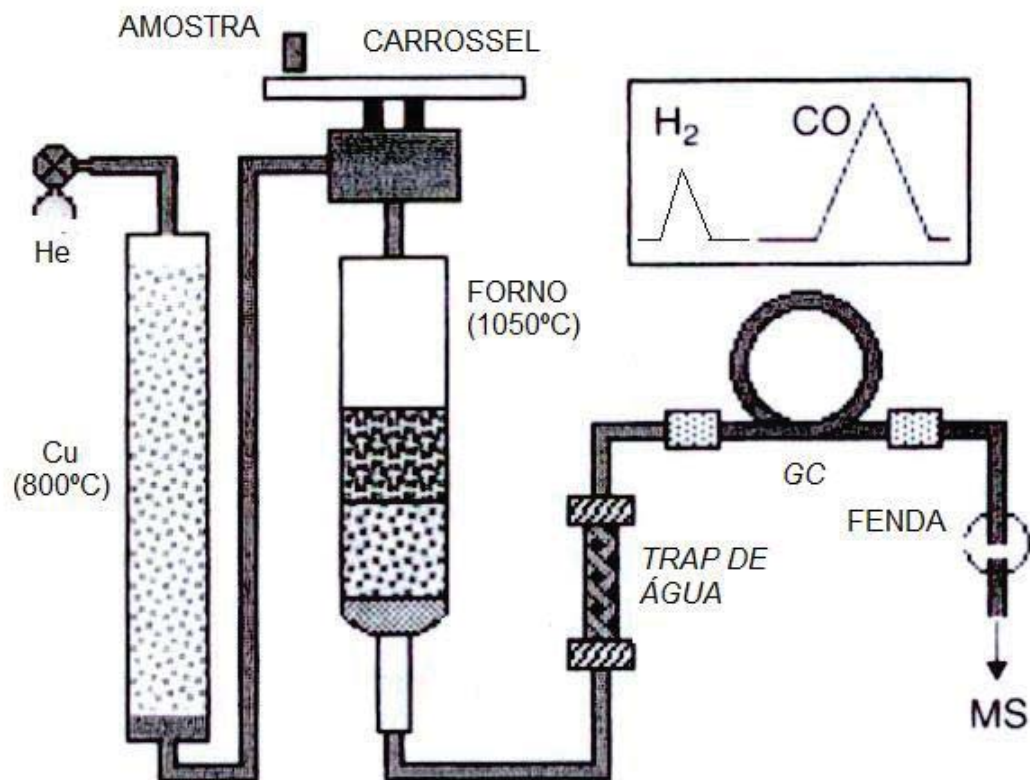
Foi levado em consideração que, a pirólise com fluxo através de um metal redutor, como o níquel, é questionável devido a forte absorção do hidrogênio na maioria desses metais, levando ao aparecimento de uma “cauda” no pico obtido pelo instrumento e a efeitos de memória.

Esse método deveria ser considerado como “em desenvolvimento” para materiais orgânicos.

Redução no carbono vitrificado

Acredita-se que a contribuição do carbono vitrificado no forno pirolítico como fonte de carbono seja insignificante, pois se trata de um material inerte.

Gygli et al. (1993) apresentou um método pirolítico de matéria orgânica em tubos de cerâmica sob uma corrente de gás carreador (10% H₂, 90% N₂) a uma temperatura de 1300°C. A elevada temperatura garante a conversão completa do composto em CO.



Fonte: Adaptado de GROOT, 2009.

Figura 6 – Esquema do método de análise isotópica simultânea de H e O utilizando um AE com forno de reação revestido com carbono niquelizado.

Em 1997, Koziol et al. propôs o método pirolítico para análise dos isótopos de O na matéria orgânica em um sistema online de AE-GC-IRMS. Ele substituiu as paredes de sílica, ou cerâmica, do tubo reator, que causava a troca do oxigênio entre CO e CO₂, por paredes de carbono vitrificado, livre de oxigênio. A conversão do CO para CO₂ foi evitada pela obtenção dos sinais de massa do CO, 28 e 30. A completa conversão é importante para que se evite o fracionamento isotópico.

Para análise, foram utilizadas cápsulas de Ag como recipiente de amostra. As cápsulas foram submetidas a aquecimento no interior de tubos de quartzo em uma

corrente de ar seco entre 350 e 400°C para desoxidação da prata no período de uma hora.

Kelly et al. (1998) descreveu um método pirolítico e de redução para complexos compostos orgânicos e água em um AE com reator de carbono vitrificado. Este sistema pode ser comparado ao apresentado por Werner et al. (1996). Houserou et al. (1999), seguindo a linha de Werner, descreveu método semelhante para análise de açúcares e ácidos cítricos através da configuração de AE.

Amostras sólidas foram embrulhadas em cápsulas de prata (Ag) e amostras líquidas foram adicionadas por uma seringa, seladas e, posteriormente armazenadas, para que se evitasse a oxidação, principalmente. As cápsulas foram colocadas em um carrossel de amostras e então, introduzidas no reator do AE, uma a uma. O reator consiste de vidro e possui uma camada de 20 cm de grãos de carbono vitrificado coberta por uma rede de platina na zona mais quente do forno pirolítico.

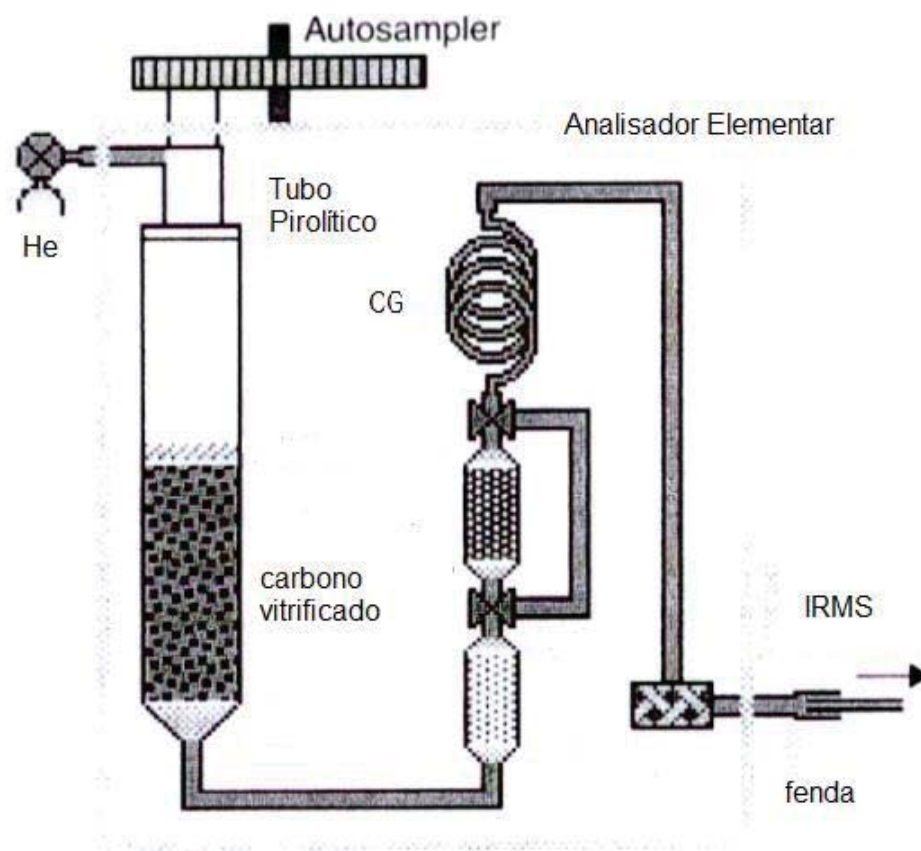
As amostras foram reduzidas a 1080°C e depois levadas através de hélio gasoso para um *trap* químico para captação de CO₂ e água, seguido de uma coluna de cromatografia para separação de H₂, N₂ e CO. A figura 7 ilustra o método.

Assim, medidas da composição isotópica de H e O puderam ser realizadas no espectrômetro de massa de razão isotópica. O método apresentou uma precisão melhor que 3 ‰. O sistema foi completamente automatizado, diminuindo a quantidade de amostra necessária para análise. O tempo de uma análise foi por volta de 15 minutos. Os capilares conectores ao IRMS foram limpos por aquecimento após 3000 amostragens.

Midwood e McGaw (1999) relataram que “o método pirolítico mostra-se como o mais plausível para análise do deutério em uma gama de amostras. Esta é a tecnologia a ser desenvolvida no futuro, permitindo análises de H em simples instrumentos CF-IRMS.”

O método de redução do carbono de amostras de água e compostos orgânicos a elevada temperatura (1450°C), para se obter simultaneamente a

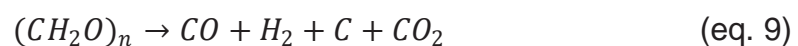
composição isotópica de H e O, foi apresentado em um folder (1999) da Finningan MAT/ThermoQuest. O volume da amostra, encapsulada, foi adicionado por meio de um carrossel coletor de amostra (*autosampler*) no interior do tubo de reação do AE. Os gases liberados, H₂ e CO, foram separados por uma coluna de cromatografia gasosa abaixo do reator de redução e assim, foram feitas medidas, online, em um IRMS. Para análises de compostos específicos, o método também pode ser aplicado, com algumas ligeiras modificações na configuração do sistema. As técnicas podem ser visualizadas na figura 8.



Fonte: Adaptado de GROOT, 2009.

Figura 7 – Sistema AE-IRMS para análise online do isótopo O em compostos orgânicos apresentado por Werner et al. (1996).

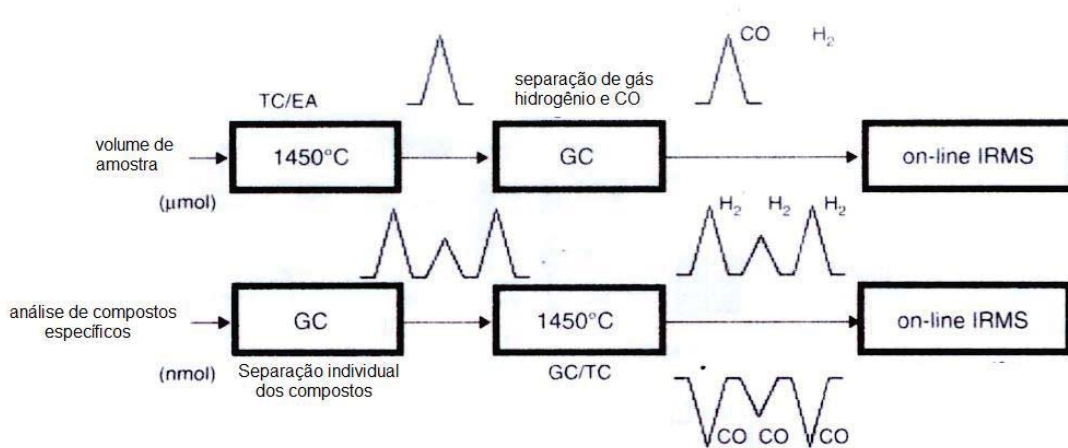
No ano de 1999, Loader e Buhay também descreveram um sistema CF-AE-Py-IRMS para matéria orgânica. A redução dos compostos pode ser observada na reação seguinte:



O gás CO_2 poderia ser medido diretamente em um IRMS, ou ser isolado criogenicamente e medido posteriormente em um clássico sistema de espectrometria ou ainda, ser coletado e armazenado para uma medida isotópica offline.

Sharp et al. (2001) apresentou um método para redução à 1450°C de amostras de água em H_2 e CO , seguida de carreamento através de uma corrente de hélio. Os gases liberados foram separados por CG e a composição isotópica de H e O foram medidas simultaneamente.

Abel et al. (2001) descreveu sobre a redução de compostos orgânicos em um reator que consistia de um tubo externo de cerâmica e outro interno de carbono vitrificado, carregado de cristais de carbono vitrificado e niquelizado, a uma temperatura de 1300°C . Com uma configuração similar, Wassenaar e Hobson (2003) analisaram amostras de queratina no interior de cápsulas de Ag, a 1270°C sob uma corrente de hélio. Os gases liberados, N_2 , H_2 e CO foram separados via cromatografia gasosa.



Fonte: Adaptado de GROOT,2009.

Figura 8 – Representação esquemática para volumes de amostra e procedimentos analíticos para compostos específicos via método pirolítico na análise isotópica de H e O em compostos orgânicos.

Em 2003, Böhlke et al., discorreu sobre a análise de O em amostras de água pela redução de carbono vitrificado a 1325°C em um AE-IRMS. As amostras, injetadas em cápsulas de prata, eram pesadas durante 2 a 3 horas para controle de evaporação. As cápsulas que apresentaram queda na massa foram descartadas.

Para medidas da composição isotópica de O, deve-se tomar certo cuidado com relação às paredes de alumina do tubo de reação. À elevadas temperaturas pode haver interferência do O da alumina sobre o gás analítico. Uma solução moderna é a substituição do tubo de alumina por tubo de sílica carbonada (SiC).

Métodos para compostos específicos

Análises de compostos específicos para composição isotópica de H e O de materiais orgânicos foram apresentadas por Hilker et al. (1999) e pelo folder (1999) da Finningan MAT/ThermoQuest. Consistia na inserção de uma amostra orgânica em um sistema CF, no qual os compostos eram separados por uma coluna de cromatografia. As frações separadas eram reduzidas em elevadas temperaturas (1450°C) em tubos de reação de carbono vitrificado, onde H₂ e CO para cada composto foi introduzido em um sistema online de IRMS.

Conclusão

Não há dúvidas de que as diversas técnicas analíticas utilizadas nas pesquisas em diferentes áreas do conhecimento científico evoluíram significativamente ao longo do século passado até os dias de hoje. Não poderia ser diferente com a espectrometria de massas.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas técnicas e sistemas acoplados à este método se apresentam como uma ferramenta importante para a abertura de novos caminhos em direção ao “micro-mundo”.

O analisador Elemental (combustão e redução) acoplado ao espectrômetro de massa, atualmente é o conjunto mais utilizado na determinação de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, enquanto que o IRMS acoplado ao conjunto pirolítico sob alta temperatura,

emprega-se nas análises de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$. O fato da técnica permitir a análise simultânea dos isótopos em destaque mencionados diminui o tempo de análise e o consumo de material, pois necessita da menor quantidade e amostras cada vez menores.

As vantagens da técnica, sem dúvida, proporcionarão grandes avanços científicos, favorecendo principalmente o campo das ciências biológicas, área que necessita de análises rápidas e precisas.

4. Referências Bibliográficas

ABELL I., JASPER J. P., FOUREL F., EATON A., MORRISON J., PHILLIPS A. and DUDD S. (2001). Stable isotopic characterization of analgic drugs. BMSS 2001, 9-12 september, 2001, Southampton, UK: 3p.

ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***. 2006. 120p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BÖHLKE J. K., MROCKOWSKI S. J. and COPLEN T. B. (2003). Oxygen isotopes in nitrate: new reference materials for ^{18}O : ^{17}O : ^{16}O measurements and observations on nitrate-water equilibration. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17(16)**: 1835-1846.

BRAND W. A. Mass Spectrometer Hardware for Analyzing stable Isotopes Ratios. In: de GROOT, PIER A. **Handbook of Stable Isotopes Analytical Techniques, volume 1**. 1ª ed. 2004. Cap. 38. p. 835-856.

BURGOYNE T. W. and HAYES J. M. *Anal Chem.* **70** (1998) 5136-5141.

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. (1961). Standard for reporting concentrations of deuterium and oxygen-18 in natural waters. *Science* **133**, 1833-1834.

CRISS, R. E. Abundance and Measurement of Stable Isotopes. In: CRISS, R. E. **Principles of Stable Isotope Distribution**. New York, 1999. Cap 1, p.23-35.

DUCATTI, C. Isótopos Estáveis Ambientais [Apostila]. 2007. 204p. Curso de Pós-graduação. Disciplina: Aplicação de Isótopos Estáveis Ambientais. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. FMVZ. UNESP

FOUREL F., MERREN T., MORRISON J., WASSENAAR L. and HOBSON K. (1998). Application of EA pyrolysis – IRMS δH and $\delta^{18}\text{O}$ analysis to animal migration patterns. *Micromass*, application note: 7p

GEHRE, M. High temperature pyrolysis: a new system for isotopic and elemental analysis. 2004, UFZ. Leipzig, Germany.

GROOT, P. A. Oxygen, Organic Materials. In: de GROOT, PIER A. **Handbook of Stable Isotopes Analytical Techniques, volume 2**. 1^a ed. 2009. Part 3, cap. 6-3.4.4. p. 545-552.

GROOT, P. A. Oxygen, Organic Materials. In: de GROOT, PIER A. **Handbook of Stable Isotopes Analytical Techniques, volume 2**. 1^a ed. 2009. Part 3, cap. 6-2.3.7. p. 483-484.

GROOT, P. A. Oxygen, Organic Materials. In: de GROOT, PIER A. **Handbook of Stable Isotopes Analytical Techniques, volume 2**. 1^a ed. 2009. Part 3, cap. 1-3.2.4. p. 179-187.

GYGLI A. (1993). Microdetermination of oxygen in organic compounds using a glassy carbon pyrolysis tube and nondispersive infrared detection. *Mikrochim. Acta*, **111**: 37-43

HILKERT A. W., DOUTHITT C. B., SCHLÜTER H. J. and BRAND W. A., (1999). Isotope ratio monitoring gas chromatography / mass spectrometry of D/H by high temperature conversion isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**(13): 1226-1230.

HOUEROU G., KELLY, S. D. and DENNIS M. J. (1999). Determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of sugar, citric acid and water from single strength orange juice. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **13**(13): 1257-1262.

KELLY S. D. Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability. In: ed MICHÈLE LEES. **Food authentication and traceability**. Cambridge, England, 2003. Cap. 7. p. 156-169.

KELLY, S. D., PARKER, I. G., SHARMAN M. and DENNIS M. J. (1998). On-line quantitative determination of ²H/¹H isotope ratios in organic and water samples using an elemental analyser coupled to an isotope ratio mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **33**: 735-738.

KORNEXL B. E., GEHRE M., HOLFING R. and WERNER R. A. *Rap. Com. Mass Spec.* **13** (1999) 1685-1693.

KOZIET, J. (1997). Isotope ratio mass spectrometric method for the on-line determination of oxygen-18 in organic matter. *J. Mass spectrum.*, **32(1)**: 103-108.

LOADER N. J. and BUHAY W. M. (1999). Rapid Catalytic oxidation of CO to CO₂ – on the development of a new approach to on-line oxygen isotope analysis of organic matter. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13(18)**: 1828-1832.

MATTHEWS, D. E., and HAYES, J. M. (1978). Isotope-ratio-monitoring gas chromatography-mass-spectrometry. *Analytical Chemistry* **50**, 1465-1473.

MCKINNEY, C. R., MCCREa, J. M., EPSTEIN, S., ALLEN, H. A., and UREY, H. C. (1950). Improvements in mass spectrometers for the measurement os small differences in isotope abundance ratios. *Review os Scientific Instruments* **21**, 724-730.

MIDWOOD A. J. and MCGRAW B. A. *Anal. Comm.* **36** (1999) 291-294.

OLIVEIRA Jr, O. P. **Preparação, caracterização e certificação de materiais de referência isotópicos de urânio.** 2006. 235p. Tese (Doutorado). Insituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares IPEN-CNEN-SP, autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo.

PONCIANO, C. R. **Desenvolvimento de espectrômetros de massa por tempo de vôo para PDMS e MALDI: aplicações de PDMS em compostos não voláteis.** 1996. 216p. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro.

PRESTON T. and OWENS N. J. P. *Analyst* **108** (1983) 971-977.

SCRIMGEOUR C. M., BEGLEY I. S. and THOMASON M. L. (1999). Measurement of deuterium incorporation into fatty acids by gas chromatography isotope ratios mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **13(4)**: 271-274.

SHARP Z. D., AUTODOREI V. and DURAKIEWICZ T., (2001). A rapid method for the determination of hydrogen and oxygen isotope ratios of water from water and solid hydrous substances. *Chem. Geol.*, **178(1-4)**: 197-210.

SHARP, Z. Terminology, Standards, and Mass Spectrometry. In: SHARP, ZACHARY. **Principles of Stable Isotope Geochemistry**. 1^a ed. (2007) Cap. 2. p. 15-36

SOFER Z. and SCHIEFELBEIN C. F. (1986). Hydrogen isotope ratio determinations in hydrocarbons using the pyrolysis preparation technique. *Anal. Chem.* **58**: 2033-2036.

TOBIAS H. J. and BRENNAN J. T. *Anal. Chem.* **67** (1997) 3148-3152.

WASSENAAR L.I. and HOBSON K. A. (2003). Comparative equilibration and on-line technique for determination of non-exchangeable hydrogen of keratins for use in animal migration studies. *Isotopes Environ. Health Stud.* **39(3)**: 211-217.

WERNER R. A., KORNEHL B. E., ROSSMANN A and SCHMIDT H. L., (1996). On-line determination of $\delta^{18}\text{O}$ values of organic substances. *Anal. Chem. Acta*, **319**: 159-164.