

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA
YULO AUGUSTO SILVA FREITAS

**RAZÃO ISOTÓPICA DE CARBONO ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e NITROGÊNIO ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)
DE FOLHAS DE PLANTAS NA BAHIA: INVESTIGAÇÃO SOBRE
VALORES ISOTÓPICOS DE CO_2 AMBIENTAL**

Salvador

2020

YULO AUGUSTO SILVA FREITAS

**RAZÃO ISOTÓPICA DE CARBONO ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e NITROGÊNIO ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)
DE FOLHAS DE PLANTAS NA BAHIA: INVESTIGAÇÃO SOBRE
VALORES ISOTÓPICOS DE CO_2 AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal da Bahia para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria do Rosário Zucchi

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Bispo de Souza

Salvador

2020

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Profª Drª Maria do Rosário Zucchi pela orientação nesse trabalho, pela sua grande paciência, pela sua confiança e pelo cuidado.

Ao Prof. Dr. José Roberto Bispo de Souza pela co-orientação nesse trabalho, pela paciência e instruções no laboratório.

A Profª Drª Maria das Graças Reis Martins pela disponibilidade e prestatividade.

Aos porteiros do Laboratório de Física Nuclear pelo apoio logístico e disponibilidade em desligar os equipamentos.

Aos meus amigos próximos por tornarem esse período mais agradável.

A Emilly Sales pela paciência, pelo cuidado, pelo grande apoio e companheirismo.

Ao Tharcio Cerqueira pela parceria e companheirismo.

A minha família pelo apoio.

A CAPES pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Agradecimentos	3
Resumo	8
Abstract.....	9
1 – Introdução.....	10
2 – Objetivos.....	14
2.1 – Objetivos Gerais	14
2.2 – Objetivos Específicos:	14
3 –Isótopos estáveis e fracionamento	15
4 - Carbono como uma ferramenta no estudo ambiental.....	19
5 - Fracionamento Isotópico na fotossíntese	30
5.1 - As plantas C3.....	31
5.2 - As plantas C4.....	33
5.3 - As plantas Crassuláceas (CAM).....	35
5.4 - Fatores Ambientais	38
6 - O Nitrogênio como uma ferramenta no estudo ambiental	41
7 – Áreas de estudo.....	46
7.1 – Elísio Medrado.....	46
7.2 – Feira de Santana.....	46
7.3 – Salvador	47
8 – Metodologia.....	49
8.1 – Amostragem.....	49
8.2 –Análise elementar de carbono	55
9 – Resultados e Discussão.....	61
10 – Conclusão E Perspectiva	73
11 – Referências	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tabela de Isótopos. Adaptado de: http://atom.kaeri.re.kr:8080/cgi-bin/tonmap1	15
Figura 2: Representação da energia potencial de uma molécula para isótopos pesados e leves.	17
Figura 3: Impressão digital de Carbono (Berto et al. 2019)	20
Figura 4: Valores mais comuns de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados na natureza (Adaptado de Ferreira, 2008)	21
Figura 5: Efeitos de isótopos que afetam os principais produtos vegetais..	23
Figura 6: Representação simplificada do ciclo de Calvin-Benson, ou ciclo C3.....	24
Figura 7: Representação esquemática do ciclo de Hatch-Slack, ou ciclo C4.....	25
Figura 8: Representação do processo de fotossíntese das plantas CAM.....	27
Figura 9: Variação $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em diferentes organismos terrestres e cadeia alimentar marinha ...	28
Figura 10: Valores comuns de $\delta^{13}\text{C}$ comumente encontrados na natureza.	29
Figura 11: Distribuição de frequência dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ de folhas de espécies arbóreas.....	32
Figura 12: Distribuição de frequência dos valores de ^{13}C de amostras de gramíneas.....	35
Figura 13: Distribuição de valores de $\delta^{13}\text{C}$ de 351 espécies de gramíneas (painel superior) e de 63 espécies do gênero Aloe (CAM). Fonte: Martinelli et al, 2009.....	36
Figura 14: Valores de $\delta^{15}\text{N}$ comumente encontrados na natureza.....	42
Figura 15: Histograma de frequência dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ de folhas de árvores e arbustos de formações florestais (barras cinzas) e savanas (barras pretas) brasileiras.	45
Figura 16: Mapa da Bahia com a localização das cidades amostradas.....	48
Figura 17: Liofilizador Terroni LT-1000	55
Figura 18: Amostrador automático do IRMS	56
Figura 19: Amostras sendo pesadas e empacotadas em capsulas de estanho.....	56
Figura 20: Representação do AE-EMRI.....	57
Figura 21: Esquema simplificado de um analisador elementar com saída direta para o Espectrômetro de Massa (EM).....	58
Figura 22: Esquema geral de um espectrômetro de massa. Retirado de Martinelli (2009).....	59
Figura 23: Laboratório de Isótopos Estáveis (LISE) do LFNA-IF-UFBA.....	60
Figura 24: Valores médios do $\delta^{13}\text{C}$ espécies <i>Opuntia ficus indica</i> (palma), <i>Ficus benjamina</i> (figueira benjamim), <i>Murraya paniculata</i> (murta-dos-jardins), <i>Bauhinia forficata</i> (pata de vaca), <i>Delonix regia</i> (flamboyant) coletadas nas cidades de Elísio Medrado (EM), Feira de Santana (FS) e Salvador (SSA)	63
Figura 25: $\delta^{13}\text{C}$ das espécies <i>Opuntia ficus indica</i> (Ofi), <i>Ficus benjamina</i> (Fb), <i>Murraya paniculata</i> (Mp), <i>Bauhinia forficata</i> (Bf), <i>Delonix regia</i> (Dr) nas diferentes cidades da Bahia.	64

Figura 26: Valores médios do $\delta^{15}\text{N}$ espécies <i>Opuntia ficus indica</i> (palma), <i>Ficus benjamina</i> (figueira benjamim), <i>Murraya paniculata</i> (murta-dos-jardins), <i>Bauhinia forficata</i> (pata de vaca), <i>Delonix regia</i> (flamboyant) coletadas nas cidades de Elísio Medrado (EM), Feira de Santana (FS) e Salvador (SSA)	65
Figura 27: $\delta^{15}\text{N}$ das espécies <i>Opuntia ficus indica</i> (Ofi), <i>Ficus benjamina</i> (Fb), <i>Murraya paniculata</i> (Mp), <i>Bauhinia forficata</i> (Bf), <i>Delonix regia</i> (Dr) nas diferentes cidades da Bahia.....	65
Figura 28: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosférico calculados para espécies de plantas C3: as espécies <i>Ficus benjamina</i> (figueira benjamim), <i>Murraya paniculata</i> (murta-dos-jardins), <i>Bauhinia forficata</i> (pata de vaca), <i>Delonix regia</i> (flamboyant)	71
Figura 29: Variação temporal (secular) na concentração do CO_2 atmosférico (A) e dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosférico (B). Fonte: Martinelli (2009).	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Isótopos estáveis de alguns elementos com suas respectivas abundâncias médias (em átomos %) (Martinelli, et. al. 2009).....	17
Tabela 2: Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de folhas coletadas em diferentes formações vegetais (Martinelli, 2009).....	32
Tabela 3: Efeito isotópico no processo de fixação do CO_2 pelas plantas (Farquhar et al., 1971)	37
Tabela 4: Descrição das espécies <i>Opuntia ficus indica</i> (palma), <i>Ficus benjamina</i> (figueira benjamim), <i>Murraya paniculata</i> (murta-dos-jardins), <i>Bauhinia forficata</i> (pata de vaca), <i>Delonix regia</i> (flamboyant).....	50
Tabela 5: Resultados de $\delta^{13}\text{C}$, de $\delta^{15}\text{N}$, C, N e razão C:N de folhas obtidos para as espécies <i>Opuntia ficus indica</i> (palma), <i>Ficus benjamina</i> (figueira benjamim), <i>Murraya paniculata</i> (murta-dos-jardins), <i>Bauhinia forficata</i> (pata de vaca), <i>Delonix regia</i> (flamboyant).	61
Tabela 6: Média e desvios para o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para as diferentes espécies coletadas	66
Tabela 7: Médias e desvios para o $\delta^{13}\text{C}$ para as espécies estudadas nas cidades de Elísio Medrado, Feira de Santana e Salvador.	66
Tabela 8: Resumo dos intervalos de referência de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, C/N encontrados na literatura (Martinelli et al, 2009; Colleta et al, 2009) e * encontrados pelo autor.....	66
Tabela 9: p_i/p_a obtidos para as espécies <i>Opuntia ficus indica</i> (palma), <i>Ficus benjamina</i> (figueira benjamim), <i>Murraya paniculata</i> (murta-dos-jardins), <i>Bauhinia forficata</i> (pata de vaca), <i>Delonix regia</i> (flamboyant).....	69

RESUMO

Os isótopos estáveis do carbono, em particular o ^{12}C e o ^{13}C em abundância natural, são usados para examinar aspectos fisiológicos, ecológicos e processos biogeoquímicos relacionados aos ecossistemas, fornecendo informações importantes. Vários processos e fatores ambientais influenciam na composição isotópica das plantas, como a intensidade de luz, capacidade fotossintética, umidade atmosférica, variação na fonte de CO_2 , variação simultânea da fonte de luz e da fonte de CO_2 e, ainda, a disponibilidade de água. Devido às novas possibilidades de medidas isotópicas utilizando o laser, a abundância natural de ^{13}C é uma excelente ferramenta para estudar o ecossistema e plantas. Um número crescente de estudos utiliza o fracionamento isotópico entre reservatórios de carbono ou abundância de ^{13}C em CO_2 respiratório para examinar a fonte de carbono da respiração, produção de biomassa vegetal ou sequestro de matéria orgânica em solos. A razão $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ associada ao metabolismo vegetal é, portanto, essencial para entender os valores isotópicos naturais. No presente trabalho estudou-se a razão isotópica do carbono e do nitrogênio, utilizando um analisador elementar acoplado a um sistema de espectrômetro de massa de razão isotópica (EA-IRMS), em plantas coletadas em três cidades, com diferentes características geográficas (litorânea, sertão e recôncavo baiano), da Bahia e, a partir do fracionamento isotópico do $\delta^{13}\text{C}$ e do $\delta^{15}\text{N}$, identificou-se alterações no padrão isotópico do carbono e do nitrogênio na massa foliar. A partir desses resultados foram discutidas as diferenças no padrão isotópico da massa foliar das plantas coletadas, possibilitando fazer inferências sobre as principais causas dessa variação (níveis de poluição atmosférica, disponibilidade de água e luminosidade). Determinou-se os valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ de CO_2 ambiental nas cidades de Salvador, Feira de Santana e Elísio Medrado, onde esses valores corroboram com uma tendência de empobrecimento do $\delta^{13}\text{C}$ de CO_2 atmosférico.

Palavras-Chave: isótopos estáveis, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, plantas, EA-IRMS;

ABSTRACT

Stable carbon isotopes, in particular ^{12}C and ^{13}C in natural abundance, are used to examine physiological, ecological and biogeochemical processes related to ecosystems, providing important information. Various processes and environmental factors influence the isotopic composition of plants, such as light intensity, photosynthetic capacity, atmospheric humidity, variation in the CO_2 source, simultaneous variation of the light source and CO_2 source, and also the availability of water. Winning over the new possibilities of isotopic measurements using the laser, the ^{13}C natural offer is an excellent tool for studying the ecosystem and plants. An increasing number of studies use isotopic fractionation between carbon reservoirs or an abundance of ^{13}C in respiratory CO_2 to examine the carbon source of respiration, production of plant biomass or sequestration of organic matter in soils. The $^{12}\text{C} / ^{13}\text{C}$ ratio associated with plant metabolism is, therefore, essential for the sense of natural isotopic values. In the present work, the isotopic ratio of carbon and nitrogen was studied, using an elementary analyzer coupled to an isotopic ratio mass spectrometer (EA-IRMS) system, in plants collected in three cities, with different geographical characteristics (coastal, the scrubland in the northeast region and around the Todos os Santos Bay), from Bahia and, from the isotopic fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, changes in the isotopic pattern of carbon and nitrogen in the leaf mass were identified. From these results, they were discussed as isotopic standard differences in the leaf mass of the collected plants, making it possible to make inferences about the main causes of this variation (atmospheric levels, water availability and luminosity). In addition, the isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ of environmental CO_2 were determined in the cities of Salvador, Feira de Santana and Elísio Medrado, where these values corroborate a trend of impoverishment of $\delta^{13}\text{C}$ of atmospheric CO_2 .

Key words: stable isotopes, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, plants, EA-IRMS;

1 – INTRODUÇÃO

Existem dois isótopos estáveis de carbono, ^{12}C e ^{13}C . A maior parte do carbono é constituída por ^{12}C (98,9%), com 1,1% sendo ^{13}C . Esses isótopos estão desigualmente distribuídos entre e dentro de diferentes compostos, e essa distribuição isotópica pode revelar informações sobre os processos físicos, químicos e metabólicos, relacionados aos ciclos de carbono do ecossistema, regional e global, e fornecem informações em uma variedade de escalas temporais e espaciais. Margaret Bender (1968) e Smith & Epstein (1971), foram pioneiros nos estudos da razão isotópica de carbono em plantas, de ciclo fotossintético C3 e C4. A abundância de isótopos torna-se uma grande ferramenta para distinção de vias fotossintéticas e estudos das características geográficas, taxonômicas e ecológicas. Em seguida, o fracionamento nas plantas C3 e C4 foram explicados através de modelos mecanicistas, buscando explicar como as plantas de cada via fotossintética variam a sua composição isotópica.

A composição isotópica do CO_2 atmosférico atualmente apresenta médias -8‰ , enquanto o $\delta^{13}\text{C}$ das plantas de ciclo C3 varia de -20‰ a -35‰ devido à variabilidade na discriminação fotossintética (Dawson et al., 2002). Como consequência, o carbono que retorna à atmosfera através da liberação de CO_2 por plantas e animais é empobrecido em ^{13}C em relação à atmosfera. No ciclo fotossintético das plantas C4 (ciclo de Hatch-Slack), o fracionamento do carbono ocorre de maneira diferente daquele que acontece no ciclo das plantas C3, apresentando um fracionamento entre -8‰ a -12‰ em relação à fonte original de carbono inorgânico (Meyers, 1994).

Devido às novas possibilidades de medidas isotópicas utilizando o laser, que consiste em um aparato experimental mais barato e acessível, a abundância natural de ^{13}C é agora uma excelente ferramenta para estudar o ecossistema e, dentro dele, as plantas. Os isótopos estáveis de dióxido de carbono contêm informações exclusivas sobre os processos biológicos e físicos que trocam CO_2 entre os ecossistemas terrestres e a atmosfera. Os ecossistemas terrestres são componentes importantes do ciclo global do carbono, principalmente por meio da troca de CO_2 com a atmosfera. A abundância natural de ^{13}C é uma ferramenta fundamental para estudar o ecossistema e o ambiente; atualmente, muito se sabe sobre os processos que regulam a composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) dos reservatórios de carbono das folhas, plantas e ecossistemas e dos fluxos fotossintéticos e respiratórios de dióxido de carbono (CO_2).

Os isótopos estáveis do carbono, em especial o ^{12}C e o ^{13}C , em abundância natural, durante muito tempo foram usados para examinar aspectos fisiológicos, ecológicos e processos biogeoquímicos relacionados aos ecossistemas, fornecendo informações nas escalas de tempo e espaço. Vários processos e fatores ambientais influenciam na composição isotópica das plantas, como a intensidade de luz, capacidade fotossintética, umidade atmosférica, variação na fonte de CO_2 , variação simultânea da fonte de luz e da fonte de CO_2 , e ainda, a disponibilidade de água.

Tcherkez, Mahé, Hodges (2011) ressaltam que os efeitos isotópicos $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, associados com o metabolismo das plantas, são essenciais para entender os valores isotópicos naturais. Entretanto, efeitos isotópicos de enzimas não influenciam metabólitos separadamente, mas combinados para produzir uma redistribuição de isótopos de $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ no fluxo metabólico. O uso do $\delta^{13}\text{C}$ não se limita apenas a estudos ecofisiológicos, ecossistêmicos, mas vai além. O fracionamento durante a utilização de carbono pelo metabolismo vegetal pode alterar o $\delta^{13}\text{C}$ do carbono fonte (CO_2 fotossinteticamente fixo), causando diferenças substanciais entre CO_2 assimilado e CO_2 respirado pela vegetação ou metabólitos utilizados na produção de biomassa vegetal. O fracionamento isotópico cinético, causado por enzimas, (ou seja, discriminação de um isótopo por catálise enzimática) é devido às ligeiras diferenças na energia de ligação entre ^{12}C e ^{13}C , isótopos de substratos e estados de transição; considerando que os fracionamentos isotópicos de equilíbrio são devidos a diferentes níveis de energia livre de produtos e reagentes isotópicos. Os fracionamentos isotópicos enzimáticos são comumente medidos com ensaios *in vitro* seguidos de análises específicas de produtos ou reagentes por espectrometria de massa de razão isotópica.

Atualmente tem-se empregado grande esforço para prover com exatidão um panorama completo do metabolismo das plantas, vias de fluxo do carbono nas plantas e troca de CO_2 entre o solo, vegetação e atmosfera. A manipulação de traçadores naturais é uma ferramenta imprescindível para a pesquisa dos processos sobre o ciclo do carbono e a troca de reservatórios dentro e entre plantas, animais e ecossistemas.

Muitos processos influenciam o $\delta^{13}\text{C}$ do material foliar incluindo luz, capacidade fotossintética, disponibilidade de água, umidade atmosférica e outros, que foram amplamente estudados (Farquhar et al., 1989; Brugnoli & Farquhar, 2000; Dawson et al. 2002). Um número crescente de estudos aproveita o fracionamento isotópico entre reservatórios de carbono ou abundância

de ^{13}C em CO_2 para examinar a fonte de carbono da respiração, produção de biomassa vegetal ou sequestro de matéria orgânica em solos.

Na fotossíntese, o substrato é o CO_2 atmosférico, e o produto é biomassa foliar ou açúcar fotossintético. Segundo Lin e Ehleringer (1992) e Duranceau et al. (1999) não existe fracionamento associado à respiração celular e, portanto, a razão isotópica do CO_2 respirado deve se assemelhar a do carbono assimilado na fotossíntese, que é usado para a respiração. Porém, de acordo com Ehleringer et al. (2000), pode haver pequenas variações nas proporções de isótopos de carbono de vários componentes químicos de folhas, lixo e matéria orgânica do solo. Assim, a composição isotópica do CO_2 respirado pode variar daquela esperada com base apenas na discriminação fotossintética.

Segundo Martinelli et al. (2009) as fontes de nitrogênio para as plantas são inúmeras e a utilização do nitrogênio é um fator determinante para o desenvolvimento e crescimento das plantas, também por conta disso, as plantas desenvolveram várias formas de captar o nitrogênio da natureza, seja da atmosfera, seja do solo, pela decomposição. A composição isotópica dessas diferentes formas varia em função de vários fatores. Assim, a interpretação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados nas plantas torna-se muito mais complexa que a dos valores de $\delta^{13}\text{C}$. Geralmente o $\delta^{15}\text{N}$ determinado nos solos é da matéria orgânica depositada no solo e não das formas inorgânicas, que é o nitrogênio extraído do solo pelas plantas. Dessa forma pode-se, facilmente, observar uma diferença nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre solo e plantas.

Existe uma diferença nos valores do $\delta^{15}\text{N}$ apresentado no solo de acordo com a variação da profundidade, isso se deve, também, ao depósito constante de material orgânico de plantas nas camadas superficiais do solo e as transformações de N orgânico em N mineral, ou seja, conforme as reações de mineralização, nitrificação e desnitrificação, que ocorrem nas regiões mais profundas do solo. De acordo com Martinelli et al. (2009) esses valores podem variar de -8‰ a 21‰, onde a profundidade chega até 100 m.

A variação do $\delta^{15}\text{N}$ em plantas é perceptível nos tipos de plantas do ciclo fotossintético C3 e C4, onde as plantas do ciclo C4 não apresentam variação do seu valor por conta de mudanças ambientais, as plantas do ciclo C3 variam com mudanças climáticas, pois essas alterações influenciam na abertura e fechamento do estômato das plantas.

A composição isotópica das plantas é uma função da composição isotópica das duas principais formas inorgânicas extraídas do solo, o NH_4 e o NO_3 , além da disponibilidade dessas duas

fontes. Portanto, plantas da mesma espécie podem apresentar valores isotópicos distintos, ainda, plantas no mesmo solo, mas com profundidades diferentes de raízes, também podem apresentar valores diferentes.

O uso de isótopos estáveis continuará crescendo à medida que os pesquisadores perceberem que eles podem servir como valiosos rastreadores não-radioativos e integradores não destrutivos de como as plantas hoje, e no passado, interagem e respondem aos seus fatores abióticos e bióticos.

Neste trabalho estudou-se a razão isotópica do carbono, $\delta^{13}\text{C}$ e do nitrogênio, $\delta^{15}\text{N}$ das espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) coletadas em três cidades da Bahia, num raio de aproximadamente 200 km. A partir dos valores do $\delta^{13}\text{C}$ foliar determinou-se e discutiu-se os valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 ambiental.

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a razão isotópica, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, de material foliar das espécies de plantas *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) e a partir do $\delta^{13}\text{C}$ calcular o valor do CO_2 atmosférico nos três locais de amostragem, as cidades de Elísio Medrado, Feira de Santana e Salvador.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a razão isotópica, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, carbono total e nitrogênio total do material foliar das espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant), coletadas em três cidades, com características geográficas distintas (litorânea, sertão e recôncavo baiano);
- A partir dos resultados isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ das folhas determinar o valor do CO_2 atmosférico nos três locais de amostragem, as cidades de Elísio Medrado, Feira de Santana e Salvador.

3 –ISOTÓPOS ESTÁVEIS E FRACIONAMENTO

Átomos de um mesmo elemento químico com mesmo número atômico (Z) mas diferente número de massa (A) são chamados isótopos. Essa diferença acontece devido à desigualdade do número de nêutrons (N) desses átomos. Cada elemento químico possui formas isotópicas conhecidas e, no total, existem 275 isótopos dos 81 elementos estáveis, além de mais de 800 isótopos radioativos (Berto et al., 2019) (Figura 1).

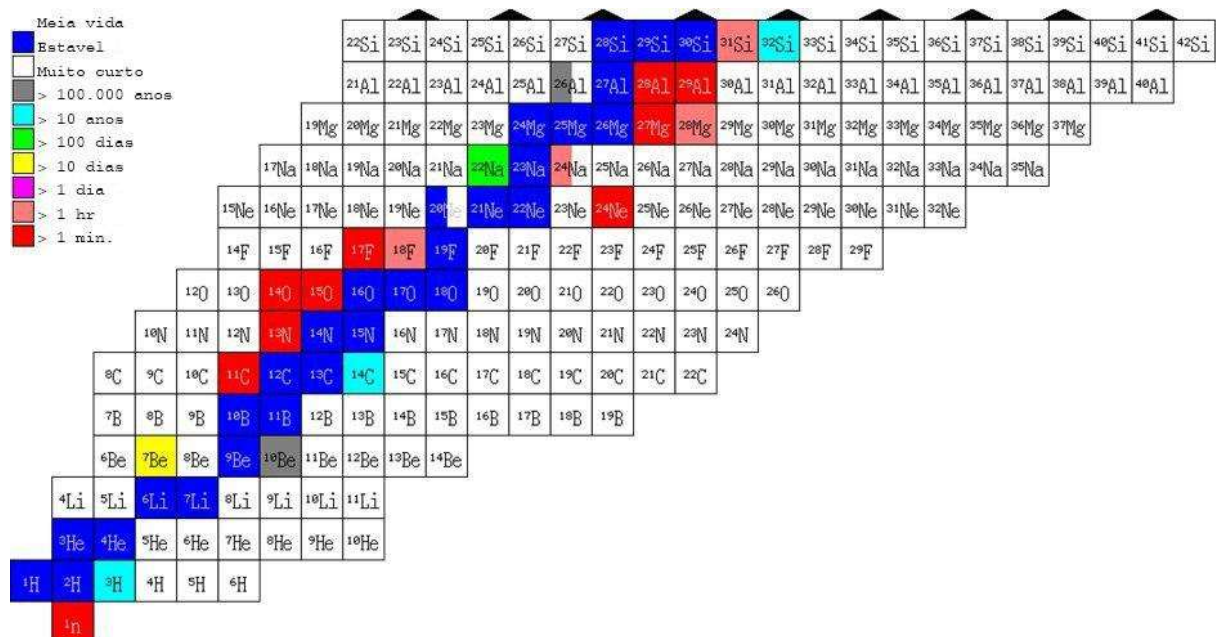


Figura 1: Tabela de Isótopos. Adaptado de: <http://atom.kaeri.re.kr:8080/cgi-bin/tonmap1>

Esses isótopos (Figura 1) são divididos em estáveis, em azul, e instáveis (ou radioativos) nas demais cores inclusive os brancos que decaem muito rapidamente e são produzidos artificialmente. Os primeiros são assim chamados devido a não alteração da sua massa ao longo do tempo e são encontrados em maiores quantidades; já os instáveis variam a sua massa, decaindo para átomos mais “leves” até atingirem a estabilidade e são mais raros de ser encontrados. Os isótopos, de um mesmo elemento químico, podem participar das mesmas reações que o isótopo mais abundante, formando compostos químicos que apresentam as mesmas características. Porém, os diferentes isótopos apresentam diferentes características, dentre elas: tamanhos e massas atômicas, dessa forma, reagindo a diferentes taxas. A

composição isotópica do material primário e seus produtos pode ser diferenciado por conta das diferenças nas características cinéticas e de equilíbrio dos isótopos mais pesados. Essa diferença é chamada de fracionamento isotópico, caracterizada por alguma variação na razão de abundância isotópica. O fracionamento pode ser causado por processos físicos, químicos ou biológicos, variando a concentração do isótopo mais pesado; essas variações estão associadas aos processos envolvidos (Clark e Fritz, 1997; Hoefs, 2009).

O fracionamento isotópico está associado às diferenças existentes nas características termodinâmicas das moléculas contendo diferentes isótopos. A energia de uma molécula de um gás é descrita pelas interações eletrônicas e nucleares, e pelas componentes de movimentos de translação, rotação e vibração de seus constituintes que dependem da massa e da temperatura do sistema; portanto, duas moléculas contendo isótopos diferentes de um mesmo átomo, em posições equivalentes, apresentam propriedades termodinâmicas que as discriminam (Hoefs, 2009).

O mecanismo do fracionamento isotópico através das propriedades termodinâmicas implica que: i) isótopos pesados se acumulam em produtos oxidados; ii) o fracionamento isotópico é favorecido em baixas temperaturas pois, em altas temperaturas, as diferenças entre os isótopos são atenuadas; e iii) o processo não é relevante no caso de reações químicas de substâncias gasosas e reações biológicas.

A redução da temperatura causa a redução da energia das moléculas que compõe o sistema; se a temperatura tender a zero Kelvin a energia tenderá à energia de ponto zero, a energia mais baixa possível que um sistema físico pode assumir, ou seja, estando no estado fundamental. Segundo Hoefs, 2009, a energia do estado fundamental de moléculas contendo isótopos pesados será diferente das que não apresentam isótopos pesados. A Figura 2 ilustra um modelo simplificado de uma reação química com caminhos para um isótopo leve e um pesado. Isso mostra, por exemplo, que as moléculas de metanol, contendo ^{18}O e ^{14}C , terão taxa de mudança de estado diferente das moléculas formadas apenas por átomos leves; essa diferença na taxa de transição causa o fracionamento. Na Figura 2, as posições nos “poços” de energia são baseadas no oscilador harmônico quântico ilustrando o estado de energia mais baixo associado ao isótopo mais pesado, e o estado de energia mais alto associado ao isótopo mais leve em que, sob

condições cinéticas, como uma reação enzimática, o isótopo mais leve é favorecido devido a uma menor energia de ativação.

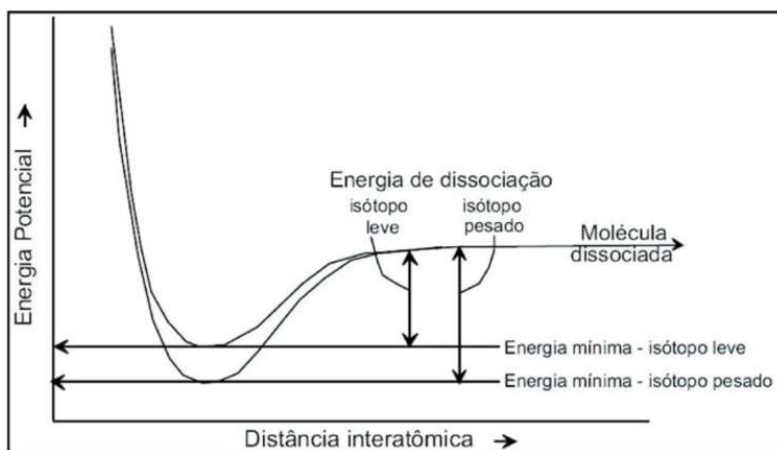


Figura 2: Representação da energia potencial de uma molécula para isótopos pesados e leves. (Modificado de: Clark e Fritz, 1997)

Como exemplo, temos para o carbono: ^{12}C e ^{13}C como estáveis, sendo o primeiro encontrado numa quantidade maior, e ^{14}C o isótopo instável. Os isótopos do carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e enxofre são muito utilizados para estudos ambientais. A Tabela 1 apresenta a abundância média desses átomos.

Tabela 1: Isótopos estáveis de alguns elementos com suas respectivas abundâncias médias (em átomos %) (Martinelli, et. al. 2009)

Elemento	Isótopos	Abundância média
Carbono	^{12}C	99,89
	^{13}C	1,11
Nitrogênio	^{14}N	99,34
	^{15}N	0,37
Oxigênio	^{16}O	99,76
	^{17}O	0,037
	^{18}O	0,199
Hidrogênio	^1H	98,98
	$^2\text{H(D)}$	0,02
Enxofre	^{32}S	95,02
	^{34}S	4,21

Os isótopos estáveis estão presentes nos ecossistemas e sua distribuição natural reflete, de forma integrada, a história dos processos físicos e metabólicos do ambiente; por isso eles podem ser usados como bons traçadores da origem de certas substâncias (Pereira & Benedito, 2007).

Um fator importante nos estudos com isótopos estáveis é a razão isotópica, que é definida como a razão do isótopo mais pesado (mais raro (A_r)) e o isótopo mais leve (mais abundante (A_a)) (Fry, 2006)

$$R = \frac{A_r}{A_a}. \quad (1)$$

Como visto na Tabela 1, a abundância isotópica dos isótopos estáveis encontradas na natureza pode ser muito pequena e, por isso, deve-se utilizar unidades de medida adequadas. Normalmente a composição isotópica é apresentada em termos da notação delta (δ) (McKiney et al., 1950), que é uma relação entre a razão do isótopo mais pesado e o isótopo mais leve ($R_{amostra}$) comparada a um padrão ($R_{padrão}$):

$$\delta X_{amostra} (\text{‰}) = \left[\left(\frac{R_{amostra}}{R_{padrão}} \right) - 1 \right] \times 1000. \quad (2)$$

Um valor positivo de δ mostra que a razão do isótopo mais pesado em relação ao mais leve é maior na amostra que no padrão, e um valor negativo do δ significa que a razão do isótopo mais pesado é menor na amostra do que no padrão. O material de referência padrão comumente usado para o carbono é o Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB). O VPDB é o padrão internacional de referência para carbono $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e oxigênio $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ criado a partir do Belemnite do Cretáceo da formação Pee-Dee da Carolina do Sul (USA); o material de referência padrão comumente utilizado para o nitrogênio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ está relacionado ao nitrogênio atmosférico.

4 - CARBONO COMO UMA FERRAMENTA NO ESTUDO AMBIENTAL

Os isótopos estáveis têm sido usados nas mais diversas áreas da ciência. Os primeiros estudos relatavam a variação isotópica do carbono encontrado nas plantas, devido ao processo de fotossíntese, tendo como fonte o CO₂ atmosférico. Mas, somente com os trabalhos de Wichiman (1952) e Craig (1953) foi mostrado que os fixadores de CO₂ são seletivos com relação aos isótopos. A seletividade dos produtores primários depende do seu ciclo fotossintético, segundo Smith e Epstein, 1971.

A fotossíntese é o método pelo qual as plantas, algas e alguns tipos de bactérias transformam a energia proveniente da luz solar em energia química. A fotossíntese é um processo físico-químico no qual os organismos sintetizam compostos orgânicos a partir de matéria inorgânica disponível, na presença de luz solar (Raven et al., 2014). As plantas, no processo metabólico, causam fracionamento quando fixam o CO₂ atmosférico, que depende do ciclo metabólico realizado. Os ciclos podem ser o C₃ de Calvin-Benson, C₄ de Hatch-Slack e CAM - Metabolismo Ácido das Crassuláceas (Mook e Vries, 2001). Animais que se alimentam de plantas também apresentam essa composição isotópica do carbono nos seus tecidos, o que fornece informações sobre a sua dieta, bem como pode ser usada para registros arqueológicos. Para cada um dos ciclos fotossintéticos, o fracionamento isotópico ocorre de maneira diferenciada.

Segundo Berto et al. (2019), o estudo de isótopos de C e N é usado para investigar a rede trófica e os fluxos de matéria entre os principais componentes de um ecossistema (por exemplo, matéria orgânica, produtores, consumidores primários e secundários); pode ser usado ainda para entender processos químicos e biológicos que ocorrem nos níveis do ecossistema e do organismo.

A análise de isótopos estáveis também pode ser uma ferramenta útil para avaliar a origem da poluição da água, da atmosfera e do solo. As duas principais reservas de carbono na natureza são representadas por carbono orgânico e inorgânico, que são caracterizados por diferentes impressões digitais isotópicas devido aos diferentes processos em que estão

envolvidos (Figura 3). O carbono inorgânico (carbonato) está envolvido no equilíbrio da troca entre (i) dióxido de carbono atmosférico, (ii) bicarbonato dissolvido e (iii) carbonato sólido.

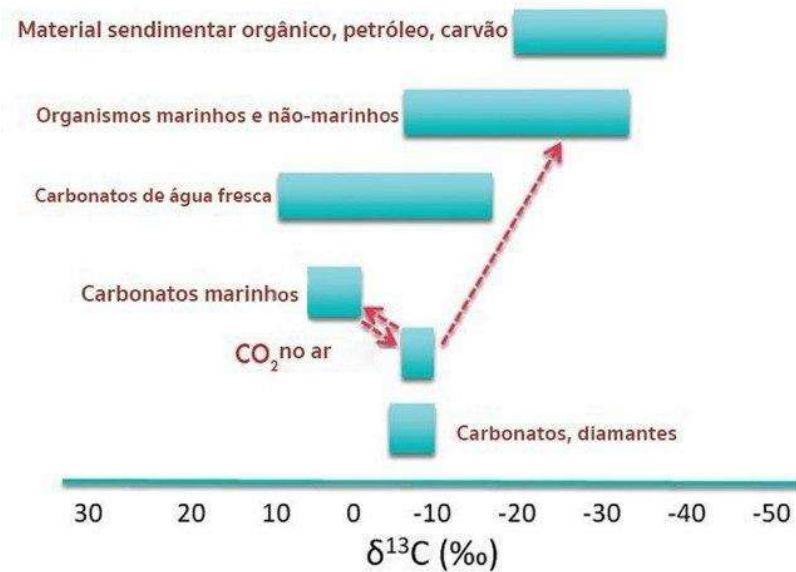


Figura 3: Impressão digital de Carbono (Berto et al. 2019)

O carbono, em sua forma elementar, está presente na natureza como carbono amorfo, grafite e diamante, sendo um dos principais elementos da Terra pois compõe cerca de 40% a 50% da matéria orgânica viva; além disso, o ciclo do carbono influencia bastante o ciclo de outros elementos importantes, como o oxigênio e o nitrogênio. Esse elemento é mais frequentemente encontrado em grandes reservatórios na forma de dióxido de carbono ou como carbonato (Berto et al. 2019).

A distribuição na natureza dos isótopos estáveis de carbono, ^{12}C e ^{13}C , mostra uma considerável variação na razão desses isótopos. Essa variação natural é de grande utilidade quando se quer traçar e quantificar as fontes, produtos e taxas de fluxos no ciclo biogeoquímico do carbono. Essa razão ou $\delta^{13}\text{C}$ nos materiais naturais de maior interesse varia entre +17‰ e -50‰, em relação ao VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite). A variação advém do fracionamento isotópico ocorrido nos processos químicos, físicos e biológicos. Há dois processos principais no ciclo do

carbono responsáveis pelo fracionamento isotópico: a assimilação do carbono por organismos vivos, que provoca um empobrecimento em ^{13}C , e as variações entre atmosfera e hidrosfera, produzindo um enriquecimento em ^{13}C . A Figura 4 mostra alguns valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ encontrados na natureza.

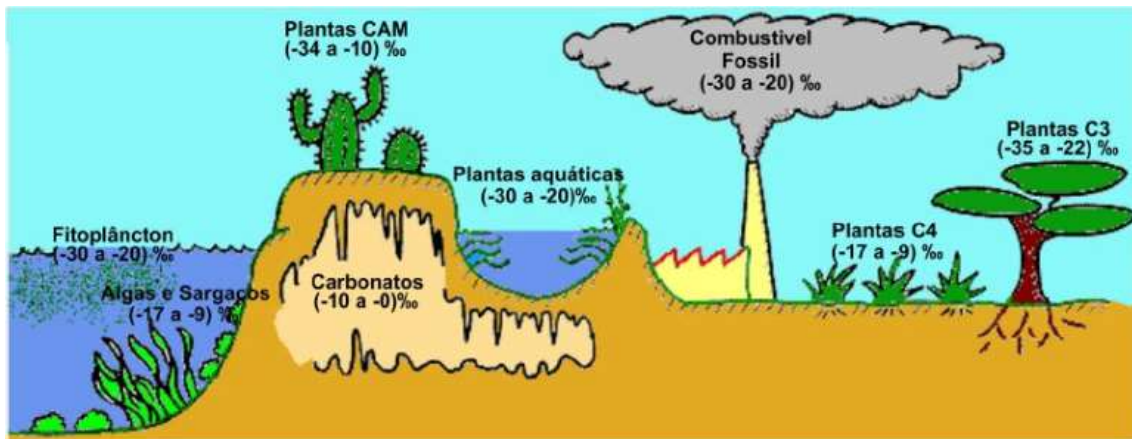


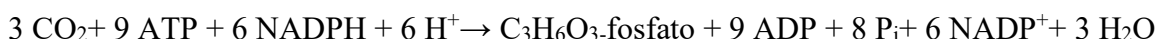
Figura 4: Valores mais comuns de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados na natureza (Adaptado de Ferreira, 2008)

As plantas produzem a energia necessária para a sua sobrevivência no processo de fotossíntese, no qual elas sintetizam compostos orgânicos a partir da água e da energia proveniente da luz solar. Esse processo é muito importante para a manutenção da vida na Terra, pois também atua retirando o gás carbônico do ar e liberando oxigênio. Durante o processo metabólico, as plantas causam fracionamento ao assimilarem o CO_2 .

O fracionamento causado por processos metabólicos foi identificado por Craig (1953), onde plantas diferentes continham quantidades diferentes de isótopos ^{13}C embora naquela época não fosse claro a razão de tais diferenças. Além disso, foi verificado por Smith e Epstein (1971) que as plantas apresentavam um empobrecimento em relação ao carbono presente na atmosfera devido ao fracionamento ocorrido no processo de fixação do CO_2 (Clark e Fritz, 1997).

As plantas são isotopicamente "mais leves" que o CO_2 no ar, o que significa que elas contêm menos ^{13}C em relação ao ^{12}C em seus tecidos do que o CO_2 atmosférico. Isto é resultado de diferenças nas taxas de difusão de $^{12}\text{CO}_2$ e $^{13}\text{CO}_2$ em folhas, e especialmente diferenças nas taxas de reação com RuBisco durante a carboxilação.

A reação de fixação do carbono, na fotossíntese, passa pelo ciclo de Calvin-Benson. As moléculas de NADPH e ATP são usadas para converter dióxido de carbono e água em compostos orgânicos através da enzima RuBisCo. A equação geral para essas reações é a seguinte:



A composição isotópica do CO₂ atmosférico atualmente apresenta médias -8‰, enquanto o δ¹³C das plantas de ciclo C₃ varia de -20‰ a -35‰ devido à variabilidade na discriminação fotossintética (Dawson et al., 2002). Como consequência, o carbono que retorna à atmosfera através da liberação de CO₂ por plantas e animais é empobrecido em ¹³CO₂ em relação à atmosfera e, portanto, o δ¹³C da respiração de toda a floresta nos ecossistemas C₃ varia de -24‰ a -30 ‰. As precisões típicas de medição do espectrômetro de massa para δ¹³C em CO₂ são normalmente 0,02–0,1‰, dependendo dos métodos utilizados (Trolier et al., 1996; Ehleringer e Cook, 1998; Ferretti et al., 2000; Ribas-Carbo et al., 2002). Como já mencionado, a fotossíntese discrimina o isótopo ¹³C mais pesado no CO₂, fixando preferencialmente ¹²CO₂ na biomassa da planta, com uma diminuição na proporção isotópica do tecido foliar das plantas C₃ de quase 20‰ em relação ao CO₂ atmosférico (Farquhar, et al. 1989). Para a fotossíntese, o substrato é CO₂ no ar e o produto é biomassa foliar ou açúcar fotossintético. Aparentemente, não há fracionamento associado à respiração mitocondrial e, portanto, a razão isotópica do CO₂ respirado deve refletir a do carbono fotoassimilado, que é subsequentemente usado para a respiração (Lin & Ehleringer 1997; mas ver Duranceau, et al. 1999). No entanto, pode haver pequenas variações nas proporções de isótopos de carbono de vários componentes químicos de folhas, lixo e matéria orgânica do solo (Ehleringer, et al. 2000); assim, a composição isotópica do CO₂ respirado pode variar daquela esperada com base apenas na discriminação fotossintética.

“Aplicações práticas dos efeitos isotópicos enzimáticos foram utilizadas para entender os mecanismos químicos foram documentadas e aplicadas à ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisco), mas o uso de fracionamento de ¹²C/¹³C em estudos metabólicos está ainda no início” (Tcherkez, Mahé e Hodges, 2011).

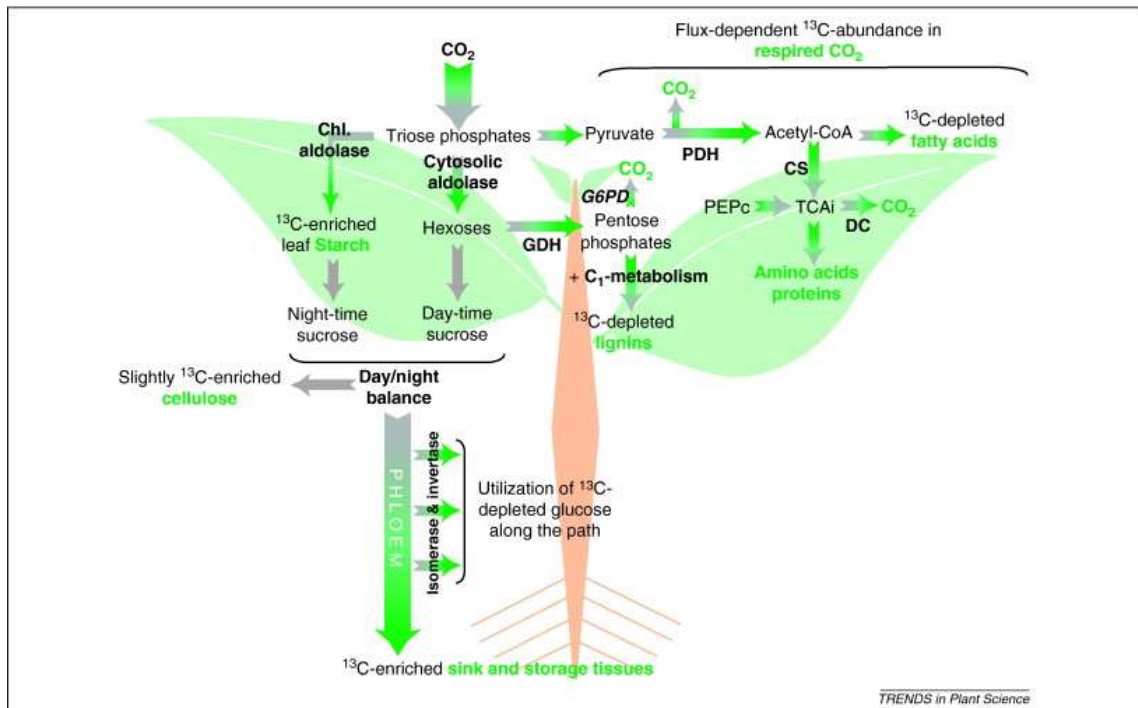


Figura 5: Efeitos de isótopos que afetam os principais produtos vegetais. As setas verdes indicam a direção do fracionamento entre isótopos (extremidade verde se refere aos processos favoráveis ao ^{13}C ; extremidade cinza se refere aos processos favoráveis ao ^{12}C). Setas cinzas ilustram processos isotopicamente neutros. Abreviações: acetil-CoA, acetil-coenzima A; Chl., cloroplástico; CS, sintetizador de citrato; DC, descarboxilases; G6PD, glicose-6-fosfato desidrogenase; GDH, 6-fosfofinato desidrogenase; PEPc, phosphoenolpyruvate carboxylase; PDH, piruvato desidrogenase; TCAi, intermediários do ciclo de ácido tricarbóxico. Fonte: Tcherkez et al, 2011.

Na Figura 5, a fotorrespiração e seu efeito de enriquecimento do ^{13}C nos reservatórios de glicina e serina não são indicados; desta maneira ilustra-se o quão complexo é o processo do fracionamento isotópico durante a fotossíntese.

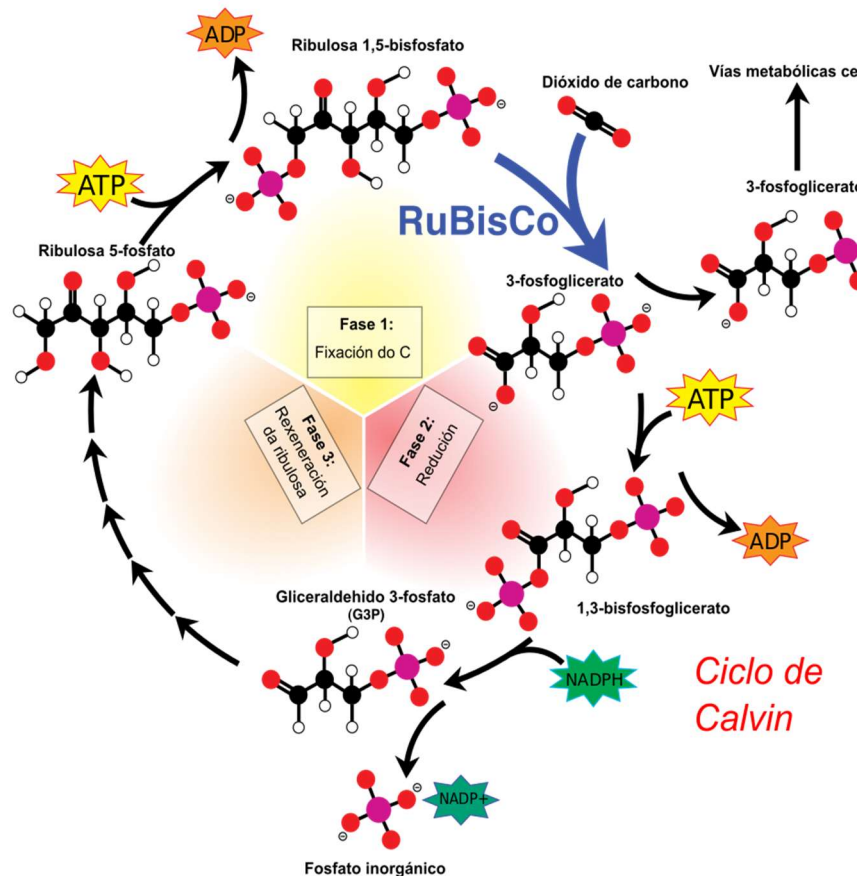


Figura 6: Representação simplificada do ciclo de Calvin-Benson, ou ciclo C3 (adaptado de Ferreira, 2008)

No ciclo de Calvin, o dióxido de carbono fixado forma um primeiro produto estável que é composto de três átomos de carbono e, por esse motivo, o ciclo ficou conhecido como ciclo C3. O ciclo C3 está ilustrado na Figura 6.

O ciclo de Calvin começa com a reação de uma molécula de CO_2 com um açúcar de cinco carbonos conhecido como ribulose 1,5-bifosfato (RuBP), pela ação da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (ou RuBisCO). Essa reação dá origem a um composto instável com seis carbonos, que logo se decompõe em duas moléculas de ácido fosfoglicérico, que é o primeiro

produto estável da reação, e cada uma das suas moléculas contém três átomos de carbono. Cada etapa do ciclo é catalisada por uma enzima específica. As reações que se seguem geram a glicose e restauram a ribulose 1,5-bifosfato, completando assim o ciclo. A cada volta do ciclo C3 uma molécula de CO_2 é fixada; logo, são necessárias seis voltas para se formar uma molécula como a glicose. O $\delta^{13}\text{C}$ das plantas C3 varia entre -35‰ e -20‰ , com valor médio de -27‰ . Isso está relacionado ao fato de que a variabilidade isotópica de ^{13}C entre as plantas C3 depende do balanço entre a difusão e a demanda enzimática efetuada pelo CO_2 (Rounick e Winterbourn, 1986). Plantas C3 são espécies que fazem o ciclo fotossintético de Calvin, a exemplo das plantas superiores de copas ou agrícolas como o arroz e a cevada.

No ciclo fotossintético das plantas C4 (ciclo de Hatch-Slack), o fracionamento do carbono ocorre de maneira diferente daquele que acontece no ciclo das plantas C3, apresentando um fracionamento entre -8‰ a -12‰ em relação à fonte original de carbono inorgânico (Meyers, 1994). O ciclo de Hatch-Slack (Figura 7) também é chamado de ciclo C4, pois os primeiros compostos intermediários sintetizados a partir do CO_2 (os ácidos málico e aspártico) são compostos por quatro carbonos.

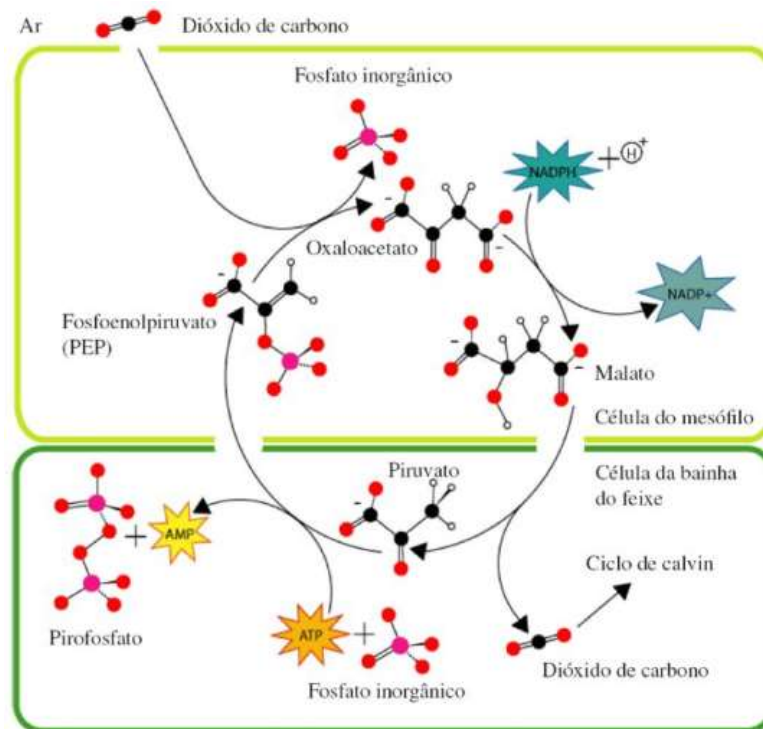


Figura 7: Representação esquemática do ciclo de Hatch-Slack, ou ciclo C4 (Fonte: Ferreira, 2008)

Para o ciclo C4 a fixação do CO₂ atmosférico é feita pela ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP-carboxilase), que funciona como catalizadora da reação, levando à formação do ácido oxaloacético que logo é convertido nos ácidos málico e aspártico. Em seguida esses ácidos, cada um com quatro carbonos, são descarboxilados ficando o CO₂ armazenado nas paredes celulares. Este CO₂ é então liberado e depois recuperado pela RuBP para seguir o ciclo de Calvin. As duas etapas (fixação do CO₂ e ciclo de Calvin) ocorrem em diferentes células. A primeira etapa acontece nas células do mesófilo e a segunda nas células da bainha.

Plantas C4 são encontradas principalmente em ambientes de climas quentes e áridos; nesse grupo o $\delta^{13}C$ está entre -17‰ e -9‰ , sendo -13‰ seu valor médio. Essas plantas são as mais cultivadas pelo homem. Fazem parte desse grupo o milho, a cana-de-açúcar, o sorgo, entre outros. Tanto o ciclo de Calvin quanto a fotorrespiração ocorrem nas células da bainha vascular, qualquer quantidade de CO₂ liberado pela fotorrespiração pode ser refixada pela via C4 que ocorre nas camadas mais externas (células do mesófilo). Assim, há um impedimento de que o CO₂ liberado pela fotorrespiração escape da folha. Como consequência, a taxa de fotossíntese líquida das plantas C4 é maior que das plantas C3 (Raven, Evert e Eichhorn, 1996).

As plantas pertencentes ao grupo CAM possuem as mesmas enzimas que as plantas C3 e C4, porém alternam esses mecanismos de fixação do CO₂ durante o dia e a noite. Essas espécies fixam o CO₂ durante a noite, usando a PEP-carboxilase, com o fracionamento normalmente encontrado nas plantas C4, e fazem a transferência dos ácidos de via C4 para a via C3 durante o dia (Farquhar, 1983). A Figura 8 representa um esquema simplificado do ciclo fotossintético

CAM. Fazem parte desse grupo plantas que crescem em locais áridos e desérticos e seu $\delta^{13}\text{C}$ varia entre -29‰ a -9‰ , com um valor médio de -19‰ . (Hayes, 1993).

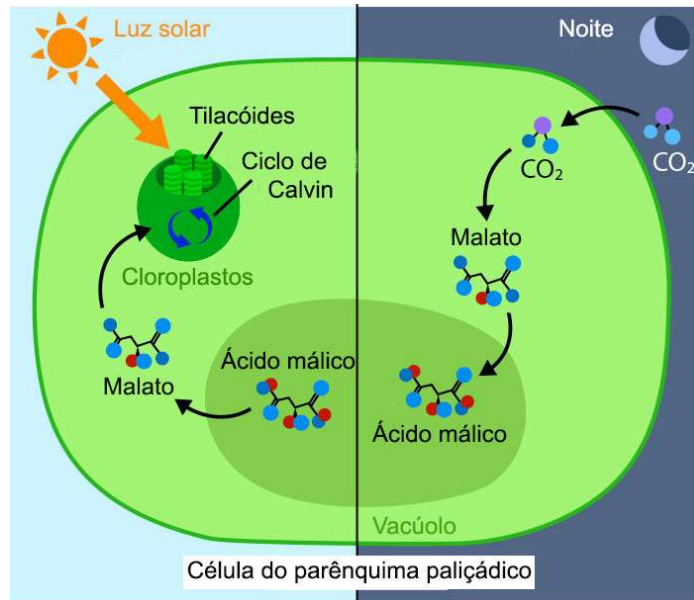


Figura 8: Representação do processo de fotossíntese das plantas CAM (retirado de <https://askabiologist.asu.edu/plantas-cam>; acessado em 20/02/2020)

Através da análise dos isótopos estáveis de carbono, também é possível diferenciar as redes tróficas terrestres e marinhas. O carbono "marinho" deriva do carbono inorgânico dissolvido (bicarbonato dissolvido) caracterizado por um valor isotópico igual a cerca de 0‰ , enquanto o carbono "terrestre" deriva do dióxido de carbono atmosférico que possui um valor $\delta^{13}\text{C}$ mais baixo (aproximadamente -7‰). Esta diferença é mantida em todos os níveis tróficos, tanto na cadeia trófica marinha quanto na terrestre (Figura 9).

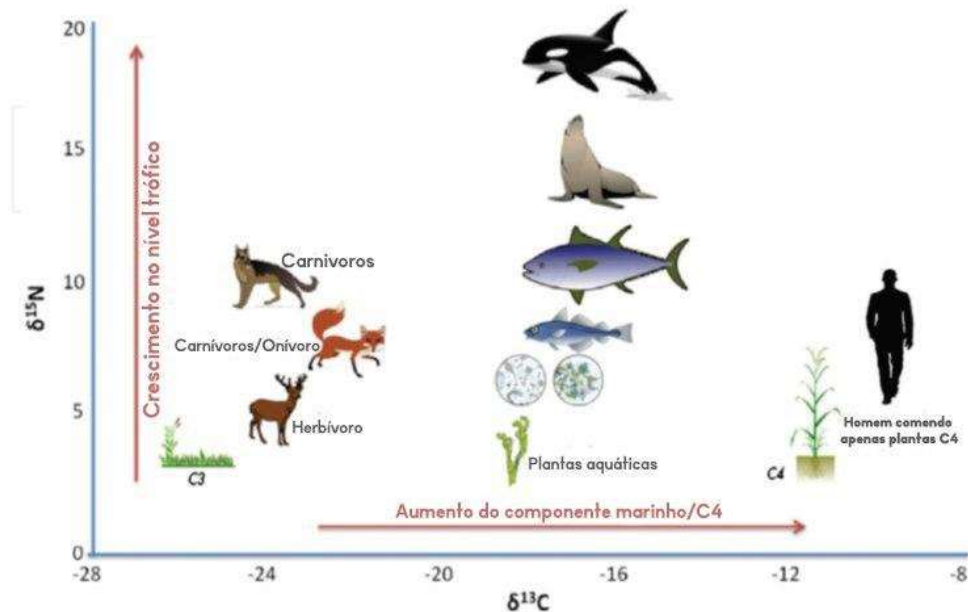


Figura 9: Variação do $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em diferentes organismos terrestres e cadeia alimentar marinha (modificado de Berto, 2019)

O uso de isótopos estáveis continuará crescendo à medida que os pesquisadores perceberem que eles podem servir como valiosos rastreadores não-radioativos e integradores não destrutivos de como as plantas hoje, e no passado, interagem e respondem aos seus fatores abióticos e bióticos.

O uso da razão isotópica do carbono como um traçador da matéria orgânica para diferenciar as possíveis fontes, sejam elas marinha ou terrestre em sedimentos, está associado à relação intrínseca que existe entre a fonte e o material encontrado. Essa característica possibilita a identificação da matéria orgânica, de diferentes tipos de fonte. A composição isotópica do carbono da matéria orgânica encontrada nos sedimentos, reflete a composição isotópica e a contribuição individuais de cada fonte (Craig, 1953; Hayes, 1993). A Figura 10 apresenta algumas faixas isotópicas atribuídas ao carbono em diferentes compostos e de fontes variadas.

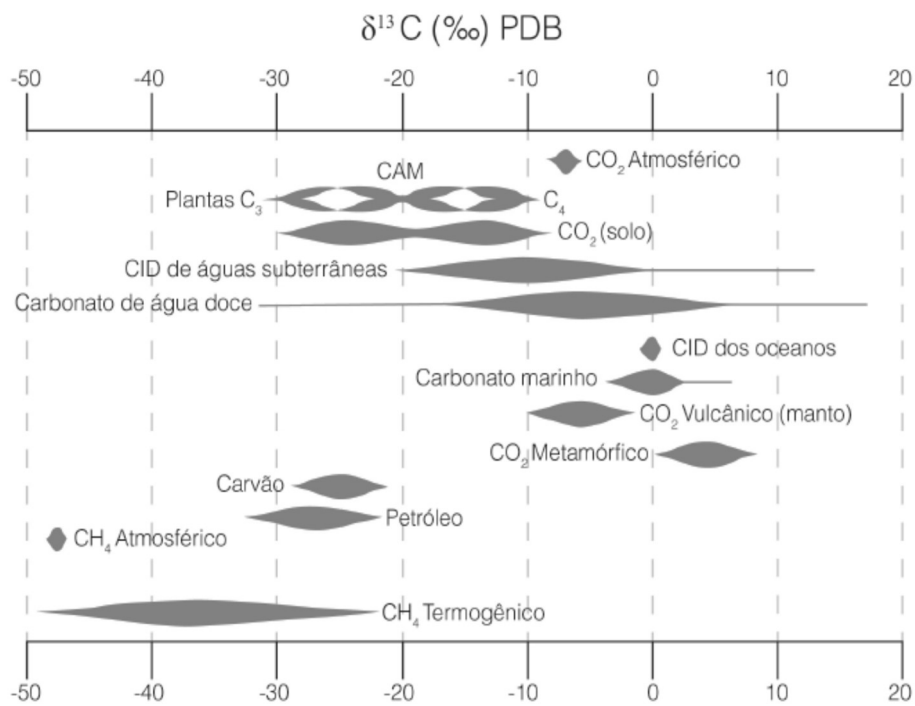


Figura 10: Valores comuns de $\delta^{13}\text{C}$ comumente encontrados na natureza (modificado de Mook e Vries, 2001).

5 - FRACIONAMENTO ISOTÓPICO NA FOTOSÍNTESE

O fator de fracionamento (α) é definido por:

$$\alpha = \frac{R_a}{R_p} \quad (3)$$

onde: R_a = relação molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da fonte, que pode ser a atmosfera, e R_p = relação molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do produto, que pode ser o carbono da planta. Como esses valores são geralmente muito próximos à unidade, definiu-se por conveniência o fator de enriquecimento isotópico (ε) ou discriminação isotópica (Δ), sendo:

$$\varepsilon = \Delta = (\alpha - 1) = \left(\frac{R_a}{R_p} - 1 \right) \quad (4)$$

Sendo R_a maior que R_p , o valor de α será maior que 1; conseqüentemente, o valor de Δ será positivo. Portanto, quando utilizamos a notação $\delta^{13}\text{C}$, seu valor é negativo para as plantas; por outro lado, quando utilizamos a notação Δ , o valor é positivo.

A relação entre δ e Δ é dada pela seguinte relação, onde troca-se ε por Δ :

$$\Delta = \frac{(\delta_a - \delta_p)}{(\delta_p + 1000)} \quad (5)$$

A composição isotópica da atmosfera pode ser considerada relativamente constante, variando de -7 a -8‰.

De acordo com Martinelli et al (2009), o equilíbrio isotópico entre o CO_2 atmosférico e o HCO_3^- dissolvido na água vai ocorrer através de uma reação de balanceamento. O $\delta^{13}\text{C}$ do bicarbonato nos oceanos varia entre 0 e 2‰, e o valor ε da reação será cerca de 6 a 8. O $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 é “mais leve” que o $\delta^{13}\text{C}$ do HCO_3^- , ou seja, o CO_2 fica empobrecido em ^{13}C em relação ao bicarbonato. Por conta das ligações atômicas, o bicarbonato “retém” mais ^{13}C em relação ao CO_2 atmosférico.

5.1 - AS PLANTAS C3

Segundo Martinelli et al (2009), os modelos de fracionamento isotópico durante a fotossíntese consideram que os átomos de ^{13}C são discriminados em duas etapas: (a) durante a difusão do CO_2 pelos estômatos, conhecido pelo valor a , que é estimado em 4,4‰; e (b) durante a fixação do CO_2 atmosférico em um composto orgânico (RuBisco), por meio da reação de carboxilação, conhecido como valor b , estimado em cerca de 30‰.

Existe, ainda, um terceiro parâmetro que influencia a composição isotópica das plantas: a relação entre a pressão interna de CO_2 na câmara estomatal/estomática (p_i) e a pressão externa da atmosfera (p_a). A equação que expressa a influência da pressão interna e da pressão externa é dada por:

$$\Delta = a + (b - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (6)$$

ou, utilizando a notação δ :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{planta-c3}} = \delta^{13}\text{CO}_2 - a - (b - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (7)$$

Na Figura 11 ilustra-se, em forma de histograma, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de folhas de árvores de florestas tropicais.

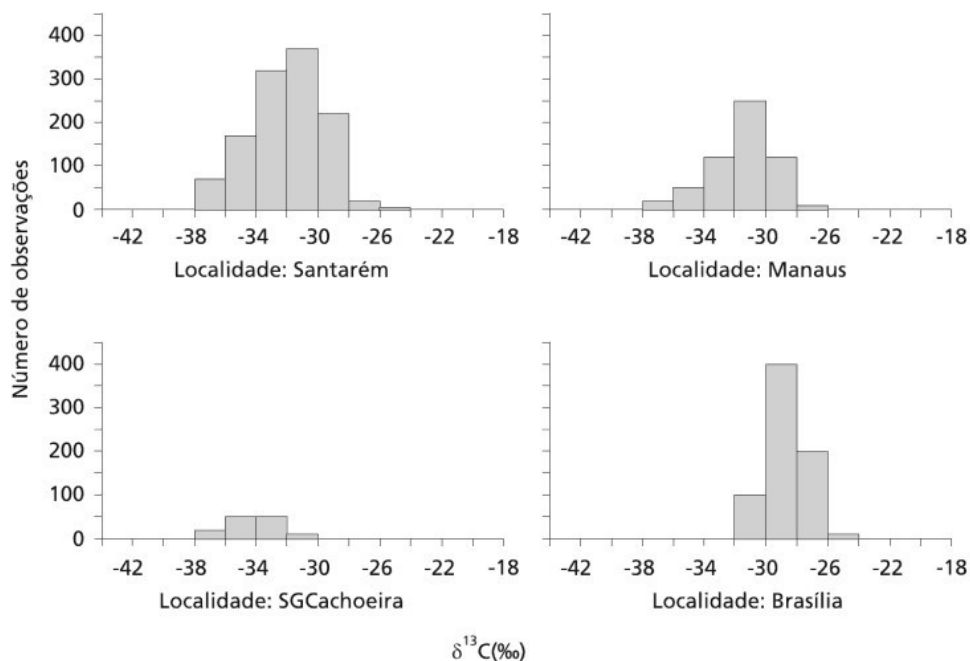


Figura 11: Distribuição de frequência dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ de folhas de espécies arbóreas coletadas em diferentes localidades. Fonte: Ometto et al. (2006) (Apud Martinelli et al, 2009).

Tabela 2: Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de folhas coletadas em diferentes formações vegetais (Martinelli, 2009)

Local	Tipo de Vegetação	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) \pm 0,3‰	Referência
Rondônia – Samuel	Terra Firme	-32,1	Martinelli et al. (1998)
S. C. Do Rio Negro (Venezuela)	Terra firme	-32,1	Medina e Minchin (1980)
Rio Amazonas	Várzea	-32,1	Martinelli et al. (1994)
Pantanal	Savana	-30,9	Victoria et al. (1995)
Brasília – Res. IBGE	Cerrado	-29,0	Miranda et al. (1997)
Hokaido (Japão)*	Floresta temperada	-29,5	Hanba et al. (1997)
Jülich (Alemanha)*	<i>F. sylvatica</i>	-29,0	Schleser (1992)
Utah (EUA)*	<i>P. contorta</i> e <i>P. tremuloides</i>	-27,3	Buchmann, Kao e Ehleringer (1997)
*Florestas temperadas			

Na Tabela 2 estão ilustrados valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de folhas coletadas em diferentes formações vegetais em diversos lugares no Brasil em florestas tropicais, no cerrado e de

florestas temperadas da Alemanha, Japão e EUA, reportados por Martinelli et al.(2006). Esses tipos de vegetações correspondem às plantas do tipo C3, os valores do $\delta^{13}\text{C}$ (‰) encontrados nas folhas são muito próximos de -30‰, sendo os valores mínimos próximos de -32‰, encontrados nas florestas tropicais, nas florestas temperadas esses valores são um pouco menores, entorno de 28‰.

5.2 - AS PLANTAS C4

Segundo Martinelli et al (2009) os valores de $\delta^{13}\text{C}$, para as plantas do tipo C3, variam de -24‰ a -38‰; já para as plantas C4 são observados valores entre -11‰ e -15‰. Pode-se observar uma redução da discriminação isotópica dos átomos de ^{13}C pelas plantas do tipo C4 comparada às plantas do tipo C3. Como já discutido anteriormente, a razão está no modo como o CO_2 é fixado nessas plantas durante a fotossíntese. Ainda segundo Martinelli et al (2009), resumidamente, o fracionamento ocorre em três fases distintas: a) durante a difusão do CO_2 atmosférico pelo estômato, como nas plantas C3; logo, o valor a é o mesmo, em torno de 4‰; b) durante a passagem do CO_2 para HCO_3^- . No mesófilo das folhas de plantas C4, o CO_2 é dissolvido e hidratado, passando a HCO_3^- . Essa etapa é denominada e_b e, como discutido no tópico 4, o fracionamento dessa reação é de aproximadamente -8‰ à temperatura de 20°C; c) durante a carboxilação do HCO_3^- . No ciclo fotossintético das plantas C4, o HCO_3^- será fixado como molécula orgânica, e não o CO_2 . O fracionamento isotópico durante a fixação do bicarbonato é menor que o fracionamento durante a fixação do CO_2 . O valor b será igual a 30‰; no caso das plantas C4, o valor calculado (denominado b_4^*) será igual a 2‰. Portanto, o fracionamento total em uma planta C4, denominado b_4 , será igual a:

$$b_4 = e_b + b_4^* \quad (8)$$

Numericamente, b_4 será igual a $-8 + 2 = -6‰$; d) durante o vazamento do CO_2 e do HCO_3^- . Uma certa proporção dessas duas espécies carbonatadas pode vazar do mesófilo e seguir os mesmos caminhos bioquímicos em relação às plantas C3. Nesse caso, o fracionamento volta a ser de 30‰ (o valor b). No entanto, como somente uma certa proporção das espécies carbonatadas vaza do mesófilo, esse tipo de fracionamento é comumente expresso como uma proporção do valor b , em geral expressa como: $\phi \cdot b$, onde ϕ exprime a proporção de espécies carbonatadas

que vaza do mesófilo. É importante notar que, para a maioria das espécies de plantas C4, essa proporção encontra-se em torno de 34% (Martinelli et al 2009).

Pode-se então compilar essas etapas e expressar matematicamente a equação que exprime o fracionamento isotópico em plantas C4:

$$\Delta = a + (b_4 + b_3 \cdot \phi - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (9)$$

Utilizando a notação δ , teremos:

$$\delta^{13}C_{planta-C4} = \delta^{13}CO_2 - a - (b_4 + b_3 \cdot \phi - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (10)$$

De acordo com Farquhar, Ehleringer e Hubick (1989), geralmente o termo $(b_4 + b_3 - \phi - a)$ é igual a zero pois, como citado anteriormente, a proporção ϕ encontra-se em torno de 34%. Dessa forma, a Eq. 10 resultará em:

$$\delta^{13}C_{planta-C4} = \delta^{13}CO_2 - a \quad (11)$$

Pela Eq. 11 nota-se que, especificamente para as plantas que seguem o ciclo fotossintético C4, a relação p_i/p_a não terá influência na composição isotópica desse tipo de planta; vale ressaltar que essa é uma observação relevante para os cálculos de plantas C4.

A Figura 12 mostra os valores de $\delta^{13}C$ de gramíneas tropicais depositadas até 1974 no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia analisadas por Medina et al., (1999). De acordo com os resultados obtidos pelos referidos autores, um grupo de gramíneas segue o ciclo fotossintético C3, com valores característicos de $\delta^{13}C$ entre -35‰ e -23‰, e outro grupo de gramíneas segue o ciclo fotossintético C4, com valores entre -15‰ e -9‰ (Martinelli et al, 2009).

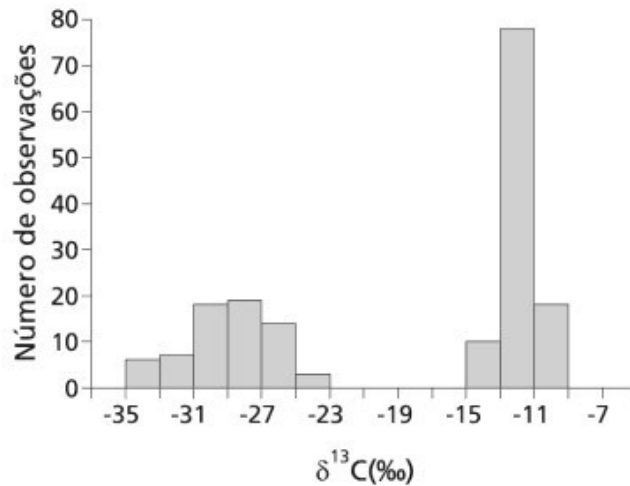


Figura 12: Distribuição de frequência dos valores de ^{13}C de amostras de gramíneas depositadas até 1974 no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Fonte: Medina et al. (1999) (Apud Martinelli et al, 2009).

5.3 - AS PLANTAS CRASSULÁCEAS (CAM)

Para Farquhar, (1983) e Martinelli et al., (2009), as plantas pertencentes ao grupo CAM (Crassulacean Acid Metabolism), possuem as mesmas enzimas que as plantas C3 e C4, porém alternam esses mecanismos de fixação do CO_2 durante o dia e a noite. Essas espécies sintetizam oxaloacetato a partir do CO_2 atmosférico, usando a PEP carboxilase. O oxaloacetato é, então, convertido e estocado como malato. À noite, essas plantas fecham seus estômatos e fazem o processo inverso, transformando o malato em CO_2 e fixando-o, como as plantas C3 o fazem. Como todo o CO_2 é fixado, não haverá fracionamento nessa fase ($\mathbf{b} = 0$). Para ser produzido, o malato resulta em um fracionamento semelhante ao das plantas C4, sem nenhum vazamento ($\phi = 0$). Portanto, a equação para as CAM se reduz a (Martinelli et al, 2009):

$$\Delta = a + (b_4 - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (12)$$

Utilizando a notação δ , teremos:

$$\delta^{13}C_{planta-CAM} = \delta^{13}CO_2 - a - (b_4 - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (13)$$

A Figura 13 mostra a distribuição de frequência de valores de $\delta^{13}C$ de folhas da família Poaceae (gramíneas) e do gênero *Aloe* (CAM), estudada por Martinelli et al., (2009).

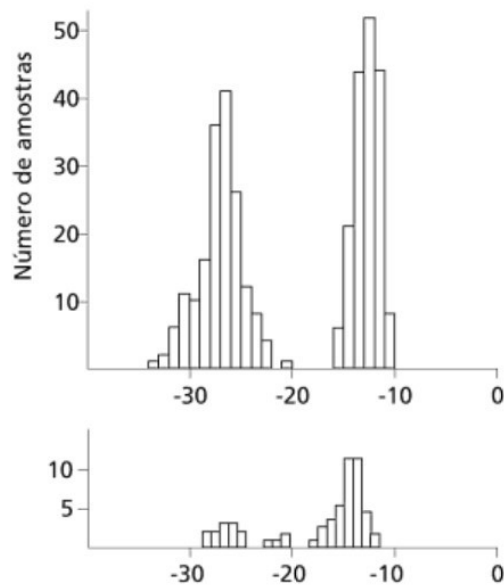


Figura 13: Distribuição de valores de $\delta^{13}C$ de 351 espécies de gramíneas (painel superior) e de 63 espécies do gênero *Aloe* (CAM). Fonte: Martinelli et al, 2009.

Na tabela 3 estão ilustrados alguns efeitos de fracionamento isotópico durante o processo de fixação do CO₂ pelas plantas (Farquhar et al., 1971).

Tabela 3: Efeito isotópico no processo de fixação do CO₂ pelas plantas (Farquhar et al., 1971)

Processos	Efeito isotópico (α)	Discriminação (‰)	Símbolo	Referência
Difusão do CO ₂ no ar através do poro estomatal ^a	1.0044	4.4	<i>a</i>	Craig (1954)
Difusão de CO ₂ no ar através da camada limite do estômato ^a	1.0029	2.9	<i>a_b</i>	Farquhar (1971)
Difusão de CO ₂ dissolvido através da água	1.0007	0.7	<i>a_i</i>	O'Leary (1988)
Fixação do C ₃ com relação a p _i	1.027	27	<i>b</i>	Farquhar & O'Leary (1993)
Fixação do CO ₂ gasoso Rubisco de plantas altas	1.030 (ph = 8)	30	<i>b₃</i>	Roeske & O'Leary (1984)
Fixação do CO ₂ gasoso Rubisco de plantas altas	1.029 (ph = 8,5)	20	<i>b₃</i>	Guy et al (1987)
Fixação de HCO ₃ ⁻ por PEP	1.0020	2.0	<i>b₄*</i>	O'Leary et al (1981)
Fixação de HCO ₃ ⁻ por carboxilase PEP	1.0020	2.0		Reibach & Benedict (1977)
Fixação de CO ₂ gasoso (em equilíbrio com HCO ₃ ⁻ a 25°C) por carboxilase PEP	0.9943	-5.7	<i>b₄</i>	Farquhar (1983)
Hidratação de equilíbrio de CO ₂	0.991	-9.0	<i>e_b</i>	Emrich et al (1970)
Hidratação de equilíbrio de CO ₂ a 25°C	0.991	-9.0	<i>e_b</i>	Mook et al (1974)
Dissolução de equilíbrio de CO ₂	1.0011	1.1	<i>e_s</i>	Mook et al (1974)

Dissolução de equilíbrio de CO ₂ na água	1.0011	1.1	e _s	O'Leary (1988)
^a Valor teórico				

5.4 - FATORES AMBIENTAIS

Os principais fatores ambientais que impactam na composição isotópica do CO₂ atmosférico são: variação da intensidade da luz, variação na fonte de CO₂ atmosférico e disponibilidade de água.

Em relação à variação da intensidade da luz, segundo Martinelli et al., (2009) a otimização o processo fotossintético as plantas mantêm seus estômatos abertos quando há baixa intensidade de luz, e sendo assim, a pressão interna (p_i) poderá ser igual à pressão atmosférica (p_a) e, portanto, a relação p_i/p_a tende, hipoteticamente, a 1. Substituindo-se a relação p_i/p_a pelo valor 1, na Eq. 9, obtém-se:

$$\delta^{13}C_{planta-C3} = \delta^{13}CO_2 - b = \delta^{13}CO_2 - 30 \quad (14)$$

Quando a intensidade de luz é alta, a planta permanece com seus estômatos mais fechados, diminuindo a pressão interna (p_i). Consequentemente, a relação p_i/p_a tende, hipoteticamente, a zero, e a Eq. 9 fica reduzida a:

$$\delta^{13}C_{planta-C3} = \delta^{13}CO_2 - a = \delta^{13}CO_2 - 4,4 \quad (15)$$

Em locais onde há baixa intensidade de luz e há livre acesso a água, as plantas tendem a ter valores menores de δ¹³C.

Ehleringer et al (1986), estudou as variações da intensidade da luz e verificou que para 25 mmol.m².d⁻¹, tem-se o δ¹³C próximo de -31‰. Usando o valor de δ¹³C do CO₂ atmosférico em cerca de 8‰, o autor calculou o valor da razão p_i/p_a por meio da Eq. 9, resultando no valor de 0,77. Para um fluxo de fótons de 50 mmol.m².d⁻¹, observou-se um valor de δ¹³C aproximadamente igual a -27‰, que resulta em uma relação p_i/p_a igual a 0,61, para o valor de δ¹³C do CO₂ atmosférico em cerca de -8‰. Dessa forma, pode-se concluir que, quando a intensidade de luz é menor, os estômatos estão mais abertos, aumentando a razão p_i/p_a. A partir dessa discussão percebe-se que os valores de p_i/p_a tendem a diminuir em direção ao topo das

árvores, onde a incidência luminosa aumenta fazendo os estômatos permanecerem mais tempo fechados, o que leva a uma diminuição na relação p_i/p_a .

Outra forma de variação da composição isotópica das plantas também pode ser ditada pela variação na fonte de CO_2 atmosférico. Estudos reportados por Martinelli et al., (2009) ilustra a situação, em que os valores de $\delta^{13}C$ de plantas coletadas nas Várzeas do rio Solimões variaram ao longo de um gradiente, em consequência das variações na composição isotópica do CO_2 atmosférico. Segundo Martinelli et al. (1991), na região do alto Solimões, o CO_2 produzido durante a noite pela respiração das plantas e da matéria orgânica do solo permanece em contato com a vegetação por mais tempo durante a manhã, quando as plantas estão fotossintetizando; assim, as plantas têm uma maior oportunidade de absorver esse CO_2 empobrecido e, consequentemente, os seus valores de $\delta^{13}C$ serão mais leves que os encontrados rio abaixo (Martinelli et al. 2009).

Se fizermos a relação p_i/p_a constante, para todas as plantas analisadas e igual a 0,6, calcula-se o valor do $\delta^{13}C$ do CO_2 atmosférico por meio da Eq. 9 que, com os valores aplicados, torna-se:

$$\delta^{13}CO_2 = \delta^{13}C_{planta-C3} + 19,8 \quad (16)$$

Os valores isotópicos encontrados de $\delta^{13}C$ das plantas pelos autores citados, à marca 0 km da do rio, referente ao ponto inicial de estudo, ficaram em torno de -35‰. Substituindo esse valor na Eq. 16, o $\delta^{13}CO_2$ será igual a -15,2‰. Os autores observaram que a cerca de 1.800 km rio abaixo o valor encontrado de $\delta^{13}C$ das plantas foi igual a -30‰; consequentemente, o valor de $\delta^{13}C$ do CO_2 atmosférico seria igual a -10,2‰. Portanto, há uma diferença média em torno de 5‰ entre a composição isotópica do CO_2 atmosférico coletado rio acima e rio abaixo (Martinelli et al, 2009).

Ao relembarmos as Eq. 9 e 10, repetidas abaixo como Eq. 17 e 18, notamos que, se tivermos os valores de $\delta^{13}C$ do CO_2 da atmosfera, poderemos calcular os valores de p_i/p_a .

$$\Delta = a + (b - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (17)$$

$$\delta^{13}C_{planta-C3} = \delta^{13}CO_2 - a - (b - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (18)$$

Outro fator predominante na variação dos valores de $\delta^{13}C$ do é a disponibilidade de água. Segundo Martinelli et al., (2009), quando as plantas estão sob baixo teor de água no solo, elas tendem a fechar os estômatos, a fim de evitar uma perda excessiva de água; além disso, ocorre uma diminuição no processo fotossintético. Se ocorrer um decréscimo em um nível maior que a entrada de CO_2 na câmara estomatal, haverá uma atenuação no valor de p_i . Logo, a relação p_i/p_a decrescerá, elevando os valores de $\delta^{13}C$ da planta.

Fazendo uma analogia com a umidade relativa do ar, quando ela é muito baixa, a fim de evitar perder água, as plantas tendem a fechar seus estômatos, diminuindo a relação p_i/p_a e, conseqüentemente, aumentando seus valores de $\delta^{13}C$. Para exemplificar esses aspectos, um estudo de Ometto et al, 2006, verificou que os valores de $\delta^{13}C$ de folhas de espécies coletadas na Floresta Nacional do Tapajós, situada próximo à cidade de Santarém, e de espécies coletadas em uma área de cerrado situada próximo à cidade de Brasília. Como a disponibilidade de água para as plantas do cerrado é sensivelmente menor que para as plantas da Floresta Nacional de Tapajós, os valores de $\delta^{13}C$ das plantas do cerrado são mais elevados que os das plantas da Floresta Nacional de Tapajós. Enquanto a maioria dos valores de plantas do cerrado se encontra agrupada entre -29 e -27‰, a maioria dos valores de plantas da floresta está entre -33 e -31‰.

6 - O NITROGÊNIO COMO UMA FERRAMENTA NO ESTUDO AMBIENTAL

A atmosfera tem na sua composição total aproximadamente 80% de nitrogênio, porém esse gás (N_2) não é absorvido diretamente do ar pelos seres humanos e plantas; para isso do ciclo do nitrogênio participam bactérias (Nitrobacter e Rhizobium), algas azuis (cianobactérias) e fungos. Devido aos óxidos de nitrogênio liberados no ar pelas atividades industriais e pelas descargas dos automóveis, aparecem novas fases transitórias no ciclo do nitrogênio.

O nitrogênio usado pelas plantas e pelos animais fica disponível devido à ação de bactérias e micro-organismos que o transforma, através do processo de fixação ($N_2 \rightarrow N_{org}$) ou nitrificação ($N_{org} \rightarrow NH_4^+$), para a sua forma amoniacal (NH_4) ou nítrica (NO_3^-). As bactérias desnitrificantes são encontradas no solo e produzem o nitrogênio livre que retorna à atmosfera fechando o ciclo. Os animais obtêm o nitrogênio, na sua forma orgânica, quando ingerem uma planta. Esse nitrogênio sai dos animais quando eles morrem, e entram em processo de decomposição, ou nas suas fezes e urina.

Na maioria das vezes a matéria orgânica dos solos apresenta valores de $\delta^{15}N$ que decrescem com a profundidade. Pode-se observar na Figura 14 alguns valores de $\delta^{15}N$ de algumas fontes.

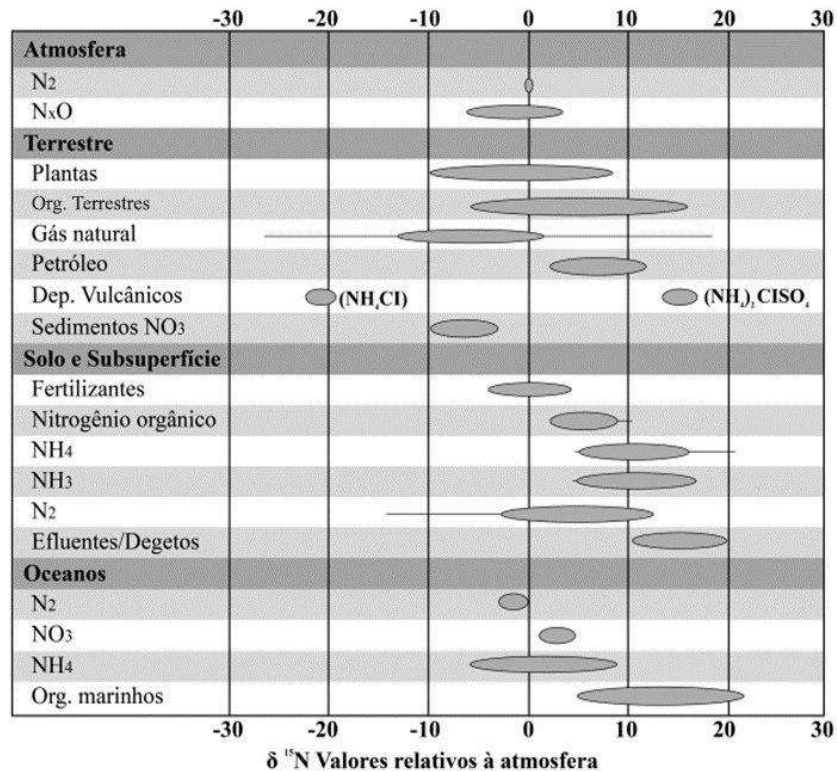


Figura 14: Valores de $\delta^{15}\text{N}$ comumente encontrados na natureza (Fonte: <http://www.sahra.arizona.edu> in Souza, 2011)

A composição isotópica do nitrogênio é afetada por alguns processos, destacando-se entre eles a fixação (conversão do N₂ não reativo em outras formas de nitrogênio), a assimilação (incorporação pelos organismos vivos de compostos que contêm nitrogênio, provocando um fracionamento médio de -0,5‰) e a produção de resíduos pelos animais (os animais são um pouco enriquecidos em ¹⁵N se comparados à sua alimentação e isso se deve ao fato da eliminação de isótopos mais leves na excreção). Os diferentes tipos de seres vivos também apresentam fracionamento no $\delta^{15}\text{N}$; por exemplo, muitas plantas apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre -5‰ e +2‰ sendo que, aquelas que tem uma associação com bactérias diazotróficas e fixam diretamente o nitrogênio da atmosfera apresentam valores entre 0 e +2‰, que é muito próximo ao nitrogênio molecular do ar ($\delta^{15}\text{N} = 0‰$), já os seres heterotróficos apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ superiores aos do solo.

Analisando a diferença entre solos tropicais e temperados, torna-se mais nítida em um histograma com dados de vários autores e reportado por Martinelli et al. (2009), como os perfis tinham profundidades de amostragem distintas, a variação foi transformada em porcentagem em relação à camada mais profunda, para facilitar a comparação.

De acordo com Martinelli et al. (2009), os principais motivos para o enriquecimento em ^{15}N com a profundidade são: (i) constante adição de matéria orgânica de plantas nas camadas superficiais do solo; (ii) as transformações de nitrogênio orgânico para nitrogênio mineral, e mesmo entre moléculas inorgânicas de nitrogênio, levam a um enriquecimento do substrato. Ou seja, conforme as reações de mineralização, nitrificação, desnitrificação e volatilização ocorrem, a matéria orgânica restante torna-se enriquecida em átomos de ^{15}N . Na superfície, esse efeito não é tão sentido porque a maioria do nitrogênio está na forma orgânica. No entanto, conforme a profundidade aumenta, também aumenta a proporção de formas inorgânicas de N em relação à orgânica.

Como foi discutido, o que leva às variações na composição isotópica do nitrogênio estável são mais complexas do que às variações da composição isotópica do carbono estável. Neste, há uma diferença constante entre plantas que seguem os ciclos fotossintéticos C3 e C4. As plantas C4 não sofrem alterações a mudanças ambientais. Por outro lado, de acordo com Farquar, Osmond e Joe (1982) a composição isotópica das plantas C3 depende da abertura e do fechamento dos estômatos que, por sua vez, dependem de variáveis ambientais como luz e disponibilidade de água.

A maior parte do nitrogênio do solo encontra-se na forma orgânica, ligado à matéria orgânica.

A principal fonte de nitrogênio utilizado pelas plantas vem do solo, que tem uma variedade das formas de N e das transformações desse elemento. A maior parte do nitrogênio encontrado no solo é na forma orgânica, havendo o processo de mineralização desse material, produzindo o NH_4 , porém não há diferença isotópica entre o nitrogênio apresentado na forma orgânica e o produto. O NH_4 , geralmente, é rapidamente transformado em NH_3 , passando pelo processo de volatilização ou nitrificação, gerando o NH_3 . De acordo com Högberg (1997, *apud* Martinelli et al. 2009), o valor médio para o fracionamento isotópico no processo de volatilização é em torno de 29‰. No processo de nitrificação este valor muda para 15 a 35‰. O NH_4 restante no solo,

torna-se enriquecido em ^{15}N , diferenciando da composição da matéria orgânica originária (Martinelli et al, 2009).

O NH_4 e o NO_3 são as principais formas inorgânicas absorvidas pelas plantas terrestres, onde a composição isotópica será uma função da composição isotópica dessas formas inorgânicas e também da disponibilidade dessas duas fontes. Dessa forma, encontra-se plantas de uma mesma espécie tendo composições isotópicas diferentes dependendo da disponibilidade das formas inorgânicas de nitrogênio e de sua composição isotópica. É importante lembrar que a composição isotópica do nitrogênio estável varia de acordo com a profundidade do solo e, assim, plantas que estejam sob o mesmo solo mas com diferentes profundidades de raízes, terão composições isotópicas distintas.

As bactérias *Rhizobium*, presentes em alguns tipos de plantas principalmente das famílias leguminosas, transformam o N_2 inerte da atmosfera em uma molécula de NH_3 disponível para a planta hospedeira. Esses tipos de plantas dispõem, além do solo, também da atmosfera como uma fonte alternativa de N.

Para se ter uma ideia da variação existente nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ de folhas de árvores de diversos tipos de vegetação brasileira, Martinelli et al. (2009) agruparam aproximadamente 3.400 dados. A média de todos esses dados para o $\delta^{15}\text{N}$ foi 3,6‰, sendo o menor valor observado -15,1‰, e o maior 12,3‰; portanto, houve uma variação de aproximadamente 27‰ entre esses dois extremos. Esses valores extremos não foram incluídos no histograma mostrado na Figura 15, mas somente os valores que ocorreram com maior frequência. Nota-se claramente dois picos distintos no histograma: um correspondente a valores em torno de -2 a 0‰, e outro, a valores entre 5 e 7‰. Os menores valores foram comuns em plantas das savanas brasileiras, enquanto os maiores valores foram mais frequentes nas florestas brasileiras. O valor médio para as savanas foi de -0,3‰ enquanto para as florestas, o valor médio foi de 5,2‰.

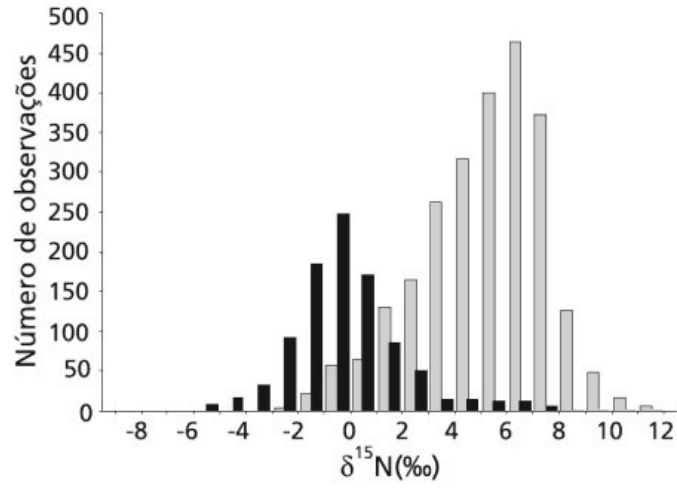


Figura 15: Histograma de frequência dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ de folhas de árvores e arbustos de formações florestais (barras cinzas) e savanas (barras pretas) brasileiras (Martinelli et. al. 2009).

7 – ÁREAS DE ESTUDO

7.1 – ELÍSIO MEDRADO

O município de Elísio Medrado está ligado aos limites através de estradas asfaltadas sendo que, da sede ao Entroncamento, a distância é de 6 km o qual está ligado à BA 046 que liga Santo Antônio de Jesus a Amargosa. A cidade limita-se: ao Norte, com o município de Santa Terezinha, com a extensão de 24 km; ao Sul, com o Município de Amargosa, com uma extensão de 30 km (Oliveira, 2010).

A área total do município é de 100 km², onde se encontra uma população estimada em 7.822 habitantes (1998) e uma densidade demográfica de 78,22 hab./ km². A sede do Município apresenta as seguintes coordenadas geográficas: 39° 31' 13''W de longitude oeste e 12° 56'40''S de latitude sul, se encontra a 390 m de altitude e fica numa distância de 224 km da capital do Estado.

De acordo com Tomasoni e Santos (2003), a posição geográfica da cidade em uma zona ecótona ou de transição, lhe confere uma grande diversidade de climas, relevos, solos, vegetação e fauna. Dentre as riquezas de Elísio Medrado, encontra-se a Serra da Jiboia, com uma grande diversidade de vegetação.

As amostragens das plantas *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca) e *Delonix regia* (flamboyant) foram realizadas na Serra da Jiboia, na cidade de Elísio Medrado.

7.2 – FEIRA DE SANTANA

Localizada no interior da Bahia, o município de Feira de Santana fica a 108 km de Salvador. Localiza-se a 12°16'00" de latitude sul e 38°58'00" de longitude oeste, a uma altitude de 234 metros. De acordo com o IBGE (2019), a população da cidade foi estimada em 614.872 habitantes.

A vegetação do município é composta por florestas tropicais, caatinga arbórea, arbustiva e herbáceas. De acordo com o IBGE (2010) a arborização urbana é de 48,3%.

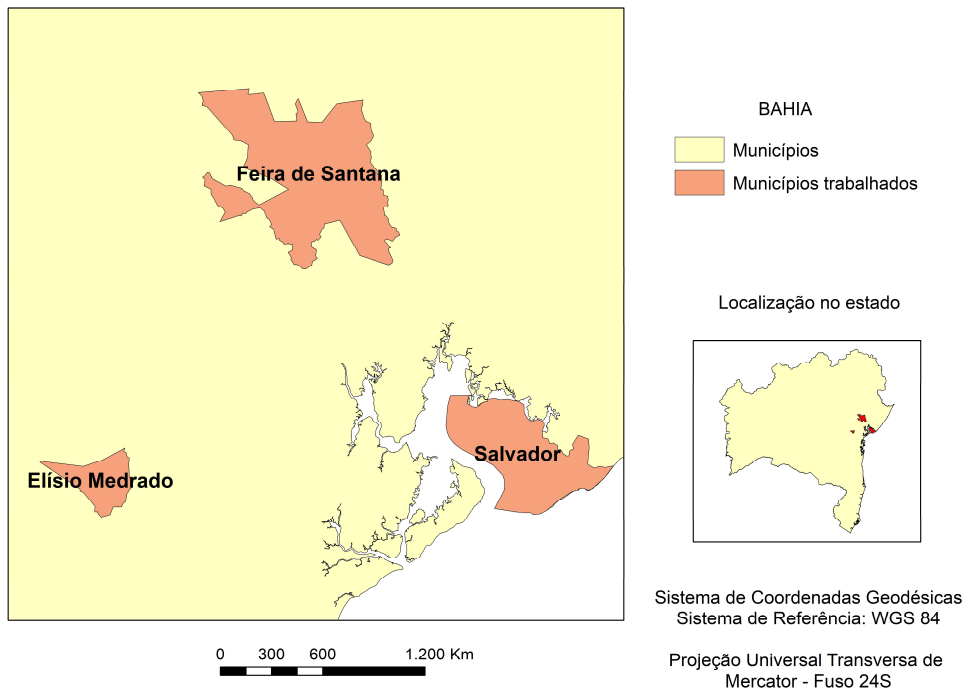
As amostragens das plantas *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca) e *Delonix regia* (flamboyant) foram realizadas no bairro do Campo Limpo de Feira de Santana.

7.3 – SALVADOR

Salvador, primeira capital do Brasil e capital do estado da Bahia, está localizada sob o cruzamento da linha dos 12° 58' 16" S com a linha dos 38° 30' 39" W na convergência dos hemisférios austral e ocidental, onde se localiza o marco da fundação da cidade. A extensão territorial do município é de 693,453 km², com uma população de 2.872.347 pessoas, de acordo com o IBGE.

A cidade de Salvador tem em seu bioma um remanescente da Mata Atlântica, a chamada Mata do Cascão. Apesar da presença de espécies exóticas, como jaqueira e mangueira, a mata está em regeneração, o que pode ser notado pela presença de espécies nativas como pau-pombo, matataúba, pau-paraíba, janaúba, ingá, jenipapeiro, sucupira e pindaíba. Apresenta ainda 39,5% de arborização das vias públicas, de acordo com o IBGE.

As amostragens das plantas *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca) e *Delonix regia* (flamboyant) foram realizadas no bairro da Pituba em Salvador.



*Figura 16: Mapa da Bahia com a localização das cidades amostradas.
(Fonte: Modificado de IBGE)*

8 – METODOLOGIA

8.1 – AMOSTRAGEM

A amostragem das plantas foi realizada em três cidades do estado da Bahia; Salvador, nos meses de setembro e outubro de 2019, Feira de Santana, no mês de maio de 2019 e Elísio Medrado, também no mês de maio em 2019, quando foram coletados cinco tipos de plantas distintas (*Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca) e *Delonix regia* (flamboyant)), perfazendo um total de 15 amostras. Os locais de estudo foram escolhidos de forma estratégica: são três cidades de características geográficas diferentes (litorânea, região do sertão e recôncavo baiano). Em Salvador, cidade litorânea, as plantas foram coletadas em uma praça pública, onde são cuidadas pela prefeitura de Salvador e pelos moradores. Em Feira de Santana, localizada no sertão baiano, as folhas foram coletadas em uma área verde pública, próxima à Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), sem maiores cuidados. Em Elísio Medrado, localizada na região do Recôncavo da Bahia, as folhas foram coletadas na Serra da Jiboia, um remanescente florestal. Para a coleta foram utilizados tesoura e estilete para auxiliar o corte das folhas ou galhos, luva para evitar o contato direto com as mãos, saco plástico para armazenar o material colhido e caixa térmica, com bolsa térmica, a uma temperatura de $\sim 4^{\circ}\text{C}$. Levados ao local de tratamento, nas dependências do Laboratório de Física Nuclear Aplicada (IF-UFBA), as folhas foram lavadas, com água corrente, e armazenadas em freezer a uma temperatura de -20°C . Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e então maceradas, de maneira a homogeneizar a sua granulometria. A Tabela 4 mostra algumas características e imagem das plantas utilizadas. Tabela 4: Descrição das espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant)

Tabela 4: Descrição das espécies Opuntia ficus indica (palma), Ficus benjamina (figueira benjamim), Murraya paniculata (murta-dos-jardins), Bauhinia forficata (pata de vaca), Delonix regia (flamboyant)

- Murta - Murraya Paniculata -

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Sapindales

Família: Rutaceae

Fotorrespiração: C3

Murraya paniculata pertencente à família Rutaceae é uma planta conhecida por sua versatilidade, sendo utilizada para fins medicinais, cerca-viva e para fins ornamentais. É nativa da Índia e foi introduzida no Brasil na composição de jardins na cidade de São Paulo.



- Nome científico: Ficus benjamina

Família: Moraceae

Ordem: Rosales

Gênero: Ficus

Fotorrespiração: C3

Ficus benjamina pertencente à família Moraceae é uma planta de grande porte. Esta figueira é muito popular devido à sua grande utilização no paisagismo, sendo o seu uso disseminado em países tropicais para extração de resina, como planta de sombra e por suas propriedades medicinais.



- Palma - *Opuntia ficus-indica*

Reino: Plantae

Divisão: Traqueophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Caryophyllales

Família: Cactaceae

Fotorrespiração: CAM

Opuntia ficus-indica é um cacto de porte arbustivo amplamente cultivado em regiões semi-áridas. Largamente cultivado por seus frutos, é utilizado também em paisagismo ou como forrageira.



- Pata de vaca - *Bauhinia variegata*

Reino: Plantae

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae

Fotorrespiração: C3

Bauhinia variegata é uma planta pertencente à família Fabaceae. Originária da China e da Índia, é muito utilizada para alimentação, forração, fins médicos e largamente usada em paisagismo no sul e no sudeste do Brasil. São leguminosas, fixadoras de nitrogênio por suas associações com bactérias específicas.



- Flamboyant - *Delonix regia*

Ordem: Fabales

Classe: Magnoliopsida

Família: Fabaceae

Fotorrespiração: C3

Delonix regia pertence à família Fabaceae, conhecida como Flamboyant, originária de Madagascar. É uma espécie de leguminosa muito cultivada em zonas tropicais, e muito popular no Brasil devido à sua floração intensa, vastamente utilizada para fins ornamentais; há também registros de seu uso para fins médicos e alimentício.



O processo de secagem que envolve redução de temperatura e de pressão, também conhecido como liofilização. A liofilização age pela sublimação da água, ou seja, a passagem do estado sólido diretamente para o estado gasoso devido ao vácuo ao qual a câmara é submetida. Para isso, o material deve estar congelado para que ela seja eficiente. O equipamento de liofilização, ou liofilizador, consiste basicamente em uma câmara de vácuo na qual o material congelado é colocado. O congelamento pode ser efetuado através de misturas frias (em torno de $-80^{\circ}C$) ou através de congeladores mecânicos. Todas as amostras investigadas neste estudo foram liofilizadas utilizando um liofilizador da marca Terroni, modelo LT 1000 (Figura 17).



Figura 17: Liofilizador Terroni LT-1000

8.2 –ANÁLISE ELEMENTAR DE CARBONO

Aproximadamente 1 mg das amostras tratadas e secas foram pesadas numa cápsula de estanho, como mostrado na Figura 19. As amostras foram colocadas em um amostrador automático, mostrado na Figura 18, sendo introduzidas, uma a uma, em um forno de oxidação operando com a temperatura de 1020°C, na presença de oxigênio, para auxiliar a combustão. Os produtos resultantes dessa combustão são arrastados por um fluxo de hélio através de uma zona de oxidação com óxido de cobre e uma zona de redução com cobre metálico, operando a 600°C. O gás carbônico (CO₂) e o vapor d'água resultantes do reator, passam por uma coluna empacotada onde são separados, analisados e quantificados por um detector de condutividade térmica. Esse detector está acoplado a um computador com um programa que gera um cromatograma onde a área do pico de cada elemento é proporcional à sua concentração, representado na Figura 20.

As concentrações dos elementos foram calculadas, com base numa curva de calibração feita com um padrão de cistina, fornecido pela empresa ThermoFinnigan. Os valores isotópicos foram referenciados em relação aos dois padrões certificados pela Agência Internacional de Energia Atômica: USGS-40 e USGS-41. O resultado foi reportado com $\delta^{13}\text{C}$ relativo ao VPDB

e ao nitrogênio atmosférico. Os erros associados à determinação da massa foram de, aproximadamente, 5%, e para os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foram de 0,3%.



Figura 18: Amostrador automático do IRMS



Figura 19: Amostras sendo pesadas e empacotadas em capsulas de estanho

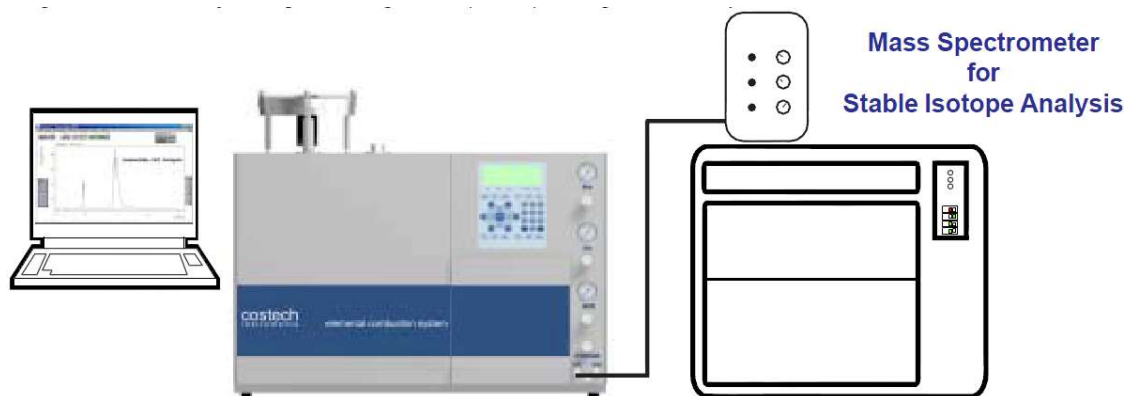


Figura 20: Representação do AE-EMRI

A Figura 21 e a Figura 22 mostram um esquema do equipamento, de forma mais simplificada e mais detalhada, respectivamente, que é composto por: amostrador automático; reator de oxidação, onde a amostra é queimada a 1020°C na presença de O₂; reator de redução; armadilha para água; coluna empacotada para a separação dos compostos; detector de condutividade térmica (DCT), utilizando a variação da condutividade térmica do hélio, que é usado como gás de arraste na determinação dos elementos presentes na amostra.

A análise elementar de razão isotópica (AE-EMRI) é uma técnica utilizada acoplando-se um analisador elementar a um espectrômetro de massa de razão isotópica para que, além da composição química, também seja analisada a composição isotópica da amostra.

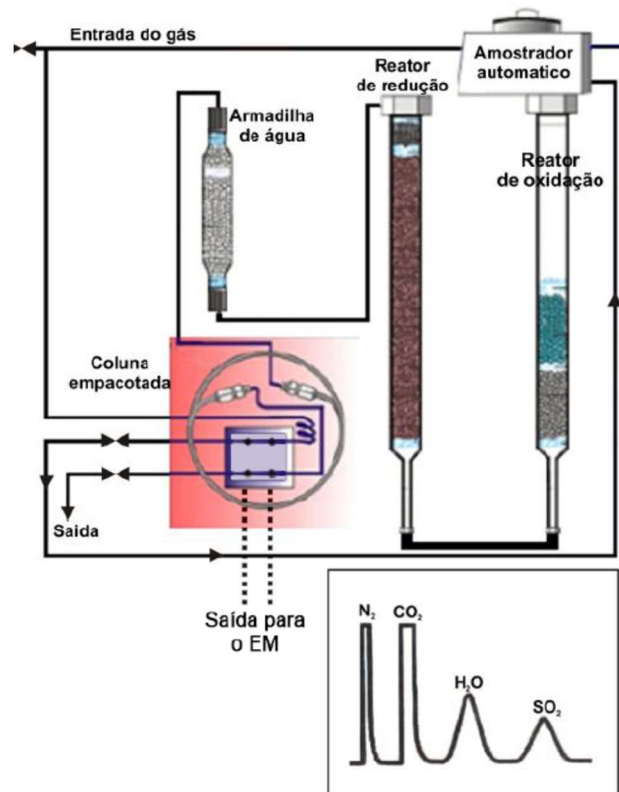


Figura 21: Esquema simplificado de um analisador elementar com saída direta para o Espectrômetro de Massa (EM) (modificado de <http://www.analiticaweb.com.br/>; acessado em 01/03/2020)

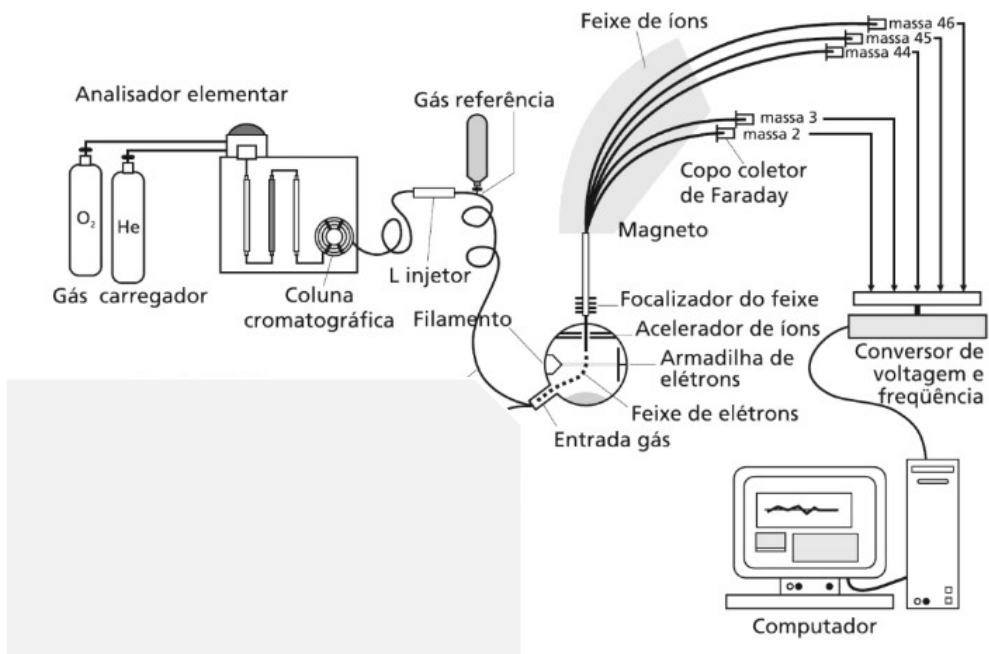


Figura 22: Esquema geral de um espectrômetro de massa. Modificado de Martinelli (2009)



Figura 23: Laboratório de Isótopos Estáveis (LISE) do LFNA-IF-UFBA. Fonte: <http://www.fis.ufba.br/laboratorio-de-isotopos-estaveis-lise>.

As amostras de folhas foram analisadas em um sistema acoplado Analisador Elementar, CHNS-O Costec, Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica, Delta-plus da Thermo Finnigan (EA-IRMS), no Laboratório de Isótopos Estáveis (LISE) do LFNA-IF-UFBA (Figura 23), para a determinação do COT, as razões isotópicas, o $\delta^{13}\text{C}$.

9 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já descrito, as plantas foram analisadas utilizando um analisador elementar acoplado a um sistema de espectrometria de massa por razão isotópica (EA-EMRI), no Laboratório de Isótopos Estáveis (LISE) do Laboratório de Física Nuclear Aplicada (IF-UFBA). Os valores isotópicos e de massa; $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, C, N e a razão C:N, do material foliar das espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) estão ilustrados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados de $\delta^{13}\text{C}$, de $\delta^{15}\text{N}$, C, N e razão C:N de folhas obtidos para as espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant).

Espécie	Localidade	Valores	$\delta^{13}\text{C} \pm 0,3\text{‰}$	$\delta^{15}\text{N} \pm 0,3\text{‰}$	C $\pm 2\%$	N $\pm 0,2\%$	C/N $\pm 0,3$
<i>Delonix regia</i> (flamboyant)	Elísio Medrado	média	-29,9	4,5	47	3,1	15,3
		DP	0,3	1,1	5	0,2	0,9
		min	-30,1	3,4	42	2,9	14,4
		max	-29,5	5,6	51	3,3	16,2
	Feira de Santana	média	-25,5	2,4	45	2,6	17,4
		DP	0,2	1,1	4	0,3	0,6
		min	-25,8	1,1	39	2,3	17,0
		max	-25,3	3,5	50	2,8	17,8
	Salvador	média	-27,7	0,0	40	1,6	24,6
		DP	0,2	1,1	5	0,2	0,7
		min	-27,9	-1,0	34	1,4	24,1
		max	-27,4	1,5	44	1,8	25,1
<i>Ficus benja- mina</i> (figueira benjamim)	Elísio Medrado	média	-31,0	1,1	37	2,1	17,2
		DP	1,6	0,8	7	0,3	0,4
		min	-32,6	0,3	30	1,8	16,8
		max	-29,4	1,9	43	2,4	17,6
	Feira de Santana	média	-29,7	1,7	42	1,6	24,4
		DP	0,3	0,8	2	0,2	1,1
		min	-30,1	0,8	39	1,5	23,6
		max	-29,4	2,3	44	1,8	25,1
	Salvador	média	-28,7	3,1	43	2,7	16,8
		DP	0,2	1,2	2	0,1	0,3
		min	-29,0	1,7	41	2,6	16,6

Espécie	Localidade	Valores	$\delta^{13}\text{C} \pm 0,3\text{‰}$	$\delta^{15}\text{N} \pm 0,3\text{‰}$	C $\pm 2\%$	N $\pm 0,2\%$	C/N $\pm 0,3$
		max	-28,4	5,0	46	2,8	17,0
<i>Murraya paniculata</i> (murta-dos-jardins)	Elísio Medrado	média	-30,1	5,7	43	3,1	15,0
		DP	0,5	1,1	4	0,5	0,7
		min	-30,8	4,6	39	2,5	14,5
		max	-29,7	7,3	47	3,5	15,8
	Feira de Santana	média	-28,1	4,6	46	2,9	16,5
		DP	0,3	0,5	4	0,1	0,1
		min	-28,5	4,2	40	2,8	16,4
		max	-27,8	5,4	50	3,1	16,6
	Salvador	média	-29,1	3,6	43	3,0	14,0
		DP	0,4	0,9	2	0,2	0,9
		min	-29,7	2,7	41	2,9	13,3
		max	-28,7	4,7	45	3,2	14,6
<i>Bauhinia forficata</i> (pata de vaca)	Elísio Medrado	média	-28,8	7,8	43	4,3	11,0
		DP	0,2	1,3	3	0,4	0,2
		min	-29,1	6,2	41	3,8	10,8
		max	-28,7	9,0	47	4,9	11,2
	Feira de Santana	média	-29,3	3,9	44	3,2	13,9
		DP	0,3	1,1	4	0,2	0,3
		min	-29,7	2,5	39	3,0	13,7
		max	-29,0	5,2	47	3,5	14,1
	Salvador	média	-32,9	5,3	41	4,0	10,4
		DP	0,2	0,4	3	0,5	0,4
		min	-33,1	5,0	37	3,7	10,1
		max	-32,6	5,7	47	4,6	10,9
<i>Opuntia ficus indica</i> (palma)	Elísio Medrado	média	-13,0	7,1	29	2,1	15,1
		DP	0,3	2,4	2	0,2	0,3
		min	-13,3	3,9	28	1,9	14,9
		max	-12,7	9,6	32	2,4	15,3
	Feira de Santana	média	-13,0	-2,0	31	1,4	23,6
		DP	0,3	1,7	2	0,1	0,2
		min	-13,3	-3,8	29	1,3	23,4
		max	-12,7	-0,4	33	1,4	23,7
	Salvador	média	-12,0	2,8	31	2,4	13,8
		DP	0,2	1,3	3	0,1	1,1
		min	-12,2	0,8	29	2,3	13,0
		max	-11,8	4,1	35	2,4	14,6

Para melhor visualizar os resultados os valores médios e os desvios foram ilustrados os valores do $\delta^{13}\text{C}$ em função das espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) Figura 24 e posteriormente os valores do $\delta^{13}\text{C}$ foram ilustrados em função das cidades Elísio Medrado (EM), Feira de Santana (FS) e Salvador (SSA) Figura 25.

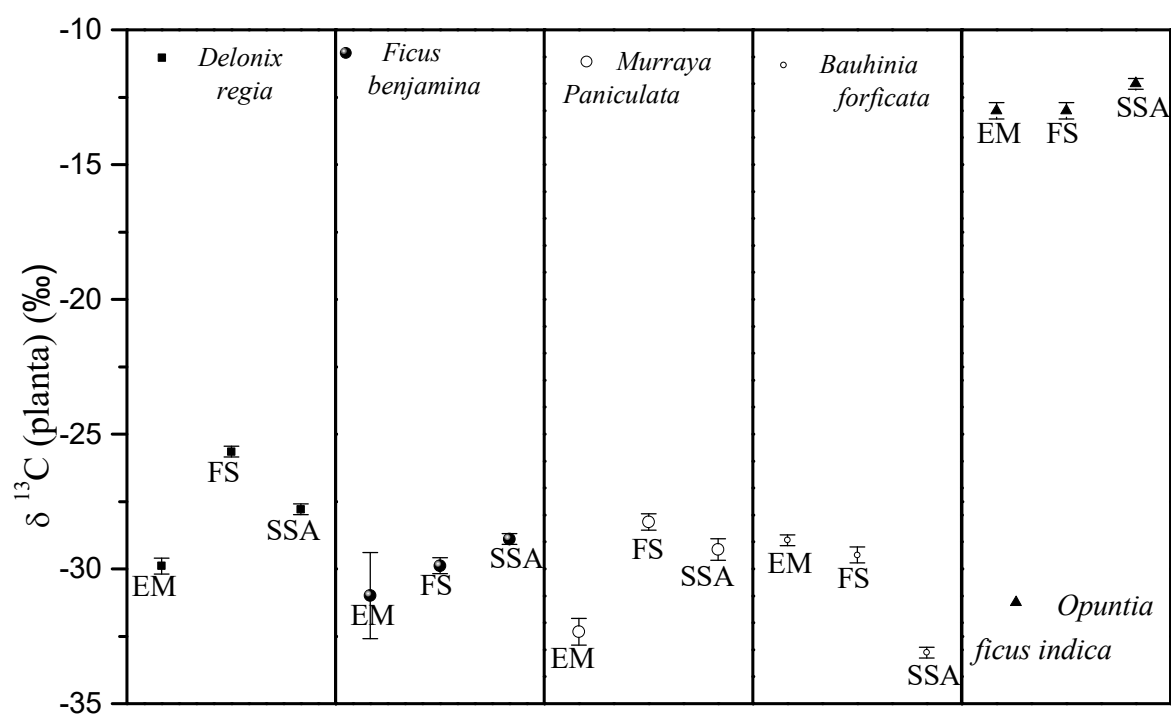


Figura 24: Valores médios do $\delta^{13}\text{C}$ espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) coletadas nas cidades de Elísio Medrado (EM), Feira de Santana (FS) e Salvador (SSA)

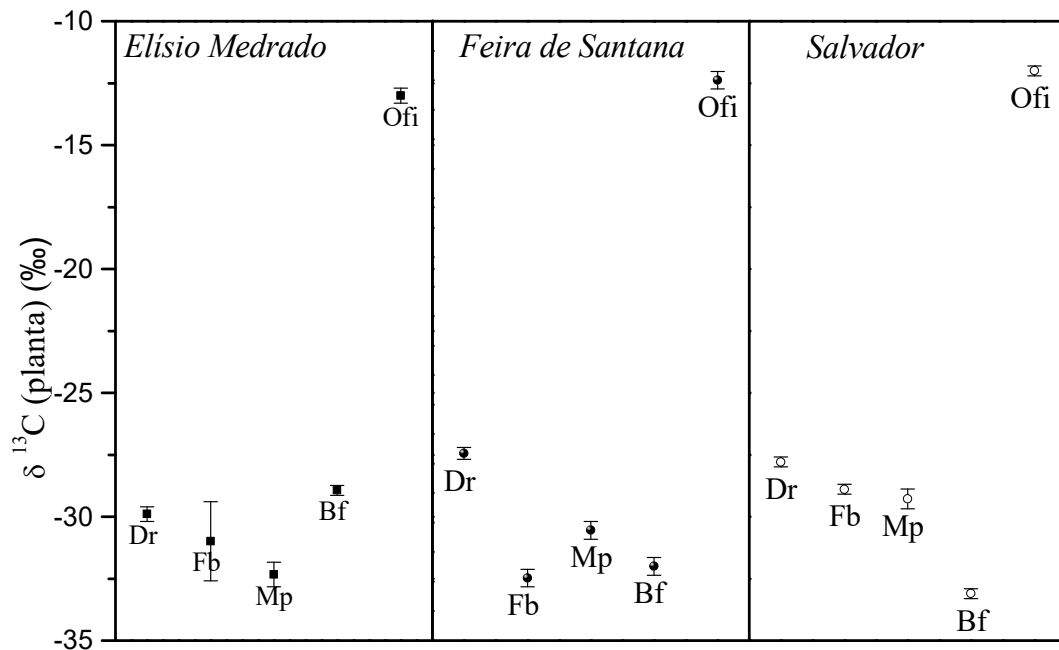


Figura 25: $\delta^{13}\text{C}$ das espécies *Opuntia ficus indica* (Ofi), *Ficus benjamina* (Fb), *Murraya paniculata* (Mp), *Bauhinia forficata* (Bf), *Delonix regia* (Dr) nas diferentes cidades da Bahia.

Para melhor visualizar os resultados os valores médios e os desvios foram ilustrados os valores do $\delta^{15}\text{N}$ em função das espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) Figura 26 e também os valores do $\delta^{15}\text{N}$ foram ilustrados em função das cidades Elísio Medrado (EM), Feira de Santana (FS) e Salvador (SSA) Figura 27.

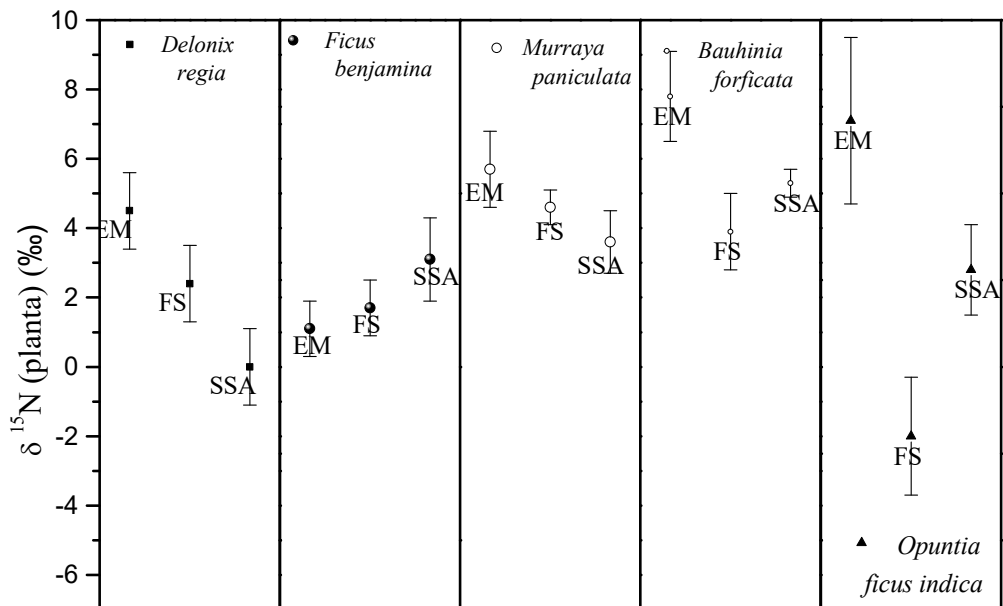


Figura 26: Valores médios do $\delta^{15}\text{N}$ espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamins), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) coletadas nas cidades de Elísio Medrado (EM), Feira de Santana (FS) e Salvador (SSA)

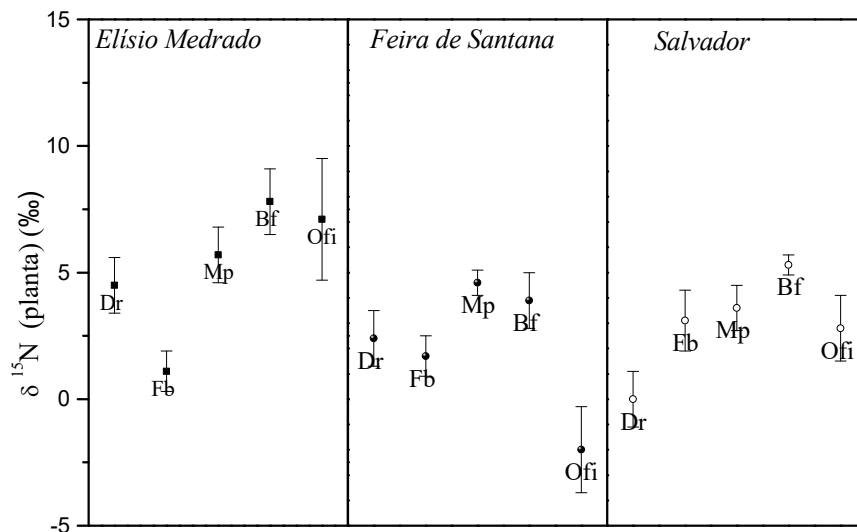


Figura 27: $\delta^{15}\text{N}$ das espécies *Opuntia ficus indica* (Ofi), *Ficus benjamina* (Fb), *Murraya paniculata* (Mp), *Bauhinia forficata* (Bf), *Delonix regia* (Dr) nas diferentes cidades da Bahia.

Na Tabela 6 estão ilustrados os valores das médias e desvios para o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para as espécies estudadas considerando as plantas coletadas nas cidades de Elísio Medrado, Feira de Santana e Salvador. Observa-se que os valores do $\delta^{15}\text{N}$ são mais altos para a espécie *Bauhinia forficata*,

sendo os valores do $\delta^{15}\text{N}$ para a espécie *Bauhinia forficata* e *Murraya paniculata* são mais altos que os demais. O valor do desvio do $\delta^{15}\text{N}$ para a espécie *Opuntia ficus indica*, são maiores que as outras, provavelmente por diferentes aportes de nitrogênio. Em relação aos valores do $\delta^{13}\text{C}$, observa-se que são bastante próximos, entre as espécies C3, considerando o desvio padrão. Verificou-se que esses valores diferem bastante, para a planta C4, sendo obtido $-12,7\text{‰}$ (Tabela 6).

Tabela 6: Média e desvios para o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para as diferentes espécies coletadas

Espécie	$\delta^{15}\text{N}$	$\pm s\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\pm s\delta^{13}\text{C}$
<i>Delonix regia</i> (Dr)	2,3	2,3	-27,7	2,2
<i>Ficus benjamina</i> (Fb)	2,0	1,0	-29,8	1,2
<i>Murraya paniculata</i> (Mp)	4,6	1,1	-29,1	1,0
<i>Bauhinia forficata</i> (Bf)	5,7	2,0	-30,3	2,2
<i>Opuntia ficus indica</i> (Ofi)	2,6	4,6	-12,7	0,6

Tabela 7: Médias e desvios para o $\delta^{13}\text{C}$ para as espécies estudadas nas cidades de Elísio Medrado, Feira de Santana e Salvador.

Cidades	$\delta^{15}\text{N}$	$\pm s\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\pm s\delta^{13}\text{C}$
Elísio Medrado (EM)	5,2	2,6	-30,0	0,9
Feira de Santana (FS)	2,1	2,6	-28,2	1,9
Salvador (SSA)	3,0	1,9	-29,6	2,3

Na Tabela 7 estão ilustrados os valores das médias e desvios para o $\delta^{13}\text{C}$ (espécies C3) e $\delta^{15}\text{N}$ para todas as espécies por cidade EM, FS e SSA. Observa-se que os valores do $\delta^{15}\text{N}$ são maiores para a cidade de EM. Observa-se que os valores dos desvios do $\delta^{15}\text{N}$ são mais altos que os do $\delta^{13}\text{C}$, devido provavelmente a diferentes fontes de aporte de nitrogênio. Em relação aos valores do $\delta^{13}\text{C}$, observa-se que são bastante próximos considerando o desvio padrão entre as espécies C3 são iguais.

Tabela 8: Resumo dos intervalos de referência de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, C/N encontrados na literatura (Martinelli et al, 2009; Colleta et al, 2009) e * encontrados pelo autor.

	C3	C4	CAM

Estômatos	Abertos durante o dia e fechados à noite	Abertos durante o dia e fechados à noite	Fechados durante o dia e abertos à noite
Enzima chave	RuBisCO	PEP case e RuBisCO	PEP case e RuBisCO
$\delta^{13}\text{C}$	-35‰ a -23‰	-15‰ a -9‰	-28‰ a -10‰
$\delta^{13}\text{C}^*$	-33‰ a -25‰	-	-13‰ a -12‰
$\delta^{15}\text{N}$	-6‰ a 12‰		
$\delta^{15}\text{N}^*$	-2‰ a 7‰		
C/N	15 - 44	-	15 - 44
C/N *	10 - 25	-	15 - 24

Referenciando-se a *Tabela 8* as espécies analisadas *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) são classificadas como plantas do tipo C3, e *Opuntia ficus indica* (palma) como CAM devido aos valores isotópicos apresentados na *Tabela 5*.

Verificou-se que os valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ do material foliar das espécies são bastante próximos; no entanto, existem diferenças entre uma mesma espécie em diferentes localidades em estudo. Essas diferenças podem estar associadas aos níveis de poluição, bem como à disponibilidade de água ou luminosidade.

Comparando os valores obtidos nesse trabalho, no LISE, (*Tabela 5*) com valores reportados por Martinelli et al, (2009) na *Tabela 2*, verificou-se que os valores isotópicos encontrados para as espécies *Ficus benjamina* e *Murraya paniculata*, em Elísio Medrado, e *Bauhinia forficata* em Salvador são equivalentes aos encontrados para a Floresta Amazônica Manaus e Santarém.

Os modelos de fracionamento isotópico durante a fotossíntese consideram que a discriminação dos átomos de ^{13}C ocorre em duas etapas: (a) durante a difusão do CO_2 pelos estômatos, conhecido pelo valor *a*, que é estimado em 4,4‰; (b) durante a fixação do CO_2 atmosférico em um composto orgânico (RuBisco), por meio da reação de carboxilação, conhecido como valor *b*, estimado em cerca de 30‰. Há ainda o envolvimento de um terceiro parâmetro que exerce uma influência decisiva na composição isotópica das plantas que é a relação entre a pressão

interna de CO₂ na câmara estomatal (p_i) e a pressão externa da atmosfera (p_a). A equação que expressa essas relações em função da notação delta, é:

$$\delta^{13}C_{planta-C3} = \delta^{13}CO_2 - a - (a - b) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (19)$$

A partir dessa equação estimou-se o valor de $\frac{p_i}{p_a}$ para as espécies *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant), a seguir na Tabela 9.

Como já referido, as plantas CAM sintetizam oxaloacetato a partir do CO₂ atmosférico, usando a PEP carboxilase. O oxaloacetato é, então, convertido e estocado como malato. À noite, essas plantas fecham seus estômatos e fazem o processo inverso, transformando o malato em CO₂ e fixando-o, como as plantas C3 o fazem. Como todo o CO₂ é fixado, não haverá fracionamento nessa fase (**b** = 0). Para ser produzido, o malato resulta em um fracionamento semelhante ao das plantas C4, sem nenhum “vazamento” ($\phi = 0$). Portanto, a equação para as CAM se reduz a (Eq. 15); em função da notação δ , teremos:

$$\delta^{13}C_{planta-CAM} = \delta^{13}CO_2 - a - (b_4 - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (20)$$

A partir dessa equação estimamos o valor de $\frac{p_i}{p_a}$ para as espécies *Opuntia ficus indica* (palma) a seguir na Tabela 9.

Tabela 9: p_i/p_a obtidos para as espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant).

Espécies	Localidade	$\frac{p_i}{p_a}$	$\frac{p_i}{p_a}$	$\frac{p_i}{p_a}$	$\frac{p_i}{p_a}$	$\frac{p_i}{p_a}$
		($\delta^{13}\text{CO}_2=6\text{‰}$)	($\delta^{13}\text{CO}_2=7\text{‰}$)	($\delta^{13}\text{CO}_2=8\text{‰}$)	($\delta^{13}\text{CO}_2=9\text{‰}$)	($\delta^{13}\text{CO}_2=10\text{‰}$)
<i>Delonix regia</i> (flamboyant)	Elísio Medrado	0,761	0,722	0,683	0,644	0,605
	Feira de Santana	0,591	0,552	0,513	0,474	0,435
	Salvador	0,675	0,636	0,597	0,557	0,518
<i>Ficus benjamina</i> (figueira benjamim)	Elísio Medrado	0,804	0,765	0,726	0,687	0,648
	Feira de Santana	0,755	0,716	0,677	0,638	0,599
	Salvador	0,716	0,677	0,638	0,599	0,560
<i>Murraya paniculata</i> (murta-dos-jardins)	Elísio Medrado	0,770	0,731	0,692	0,653	0,614
	Feira de Santana	0,691	0,652	0,613	0,574	0,535
	Salvador	0,729	0,690	0,651	0,612	0,573
<i>Bauhinia forficata</i> (pata de vaca)	Elísio Medrado	0,719	0,680	0,641	0,602	0,563
	Feira de Santana	0,738	0,699	0,660	0,621	0,582
	Salvador	0,877	0,838	0,799	0,760	0,721
<i>Opuntia ficus indica</i> (palma)	Elísio Medrado	-0,261	-0,162	-0,063	0,036	0,135
	Feira de Santana	-0,258	-0,159	-0,060	0,039	0,138
	Salvador	-0,162	-0,063	0,036	0,135	0,234

A partir dos valores isotópicos obtidos nesse trabalho (Tabela 5) foi possível determinar a razão $\frac{p_i}{p_a}$ que é a relação entre a pressão interna de CO_2 , na câmara estomatal (p_i), e a pressão externa da atmosfera (p_a), utilizando as equações 9 e 15 que expressam essas relações em função da notação delta. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 9, e os valores de $\frac{p_i}{p_a}$ foram

calculados em função dos valores $\delta^{13}\text{CO}_2 = 6, 7, 8, 9$ e 10‰ , assumindo assim um range significativo para o valor isotópico do ar. Os valores médios de $\frac{p_i}{p_a}$ são: 0,736; 0,697; 0,6575; 0,618 e 0,580 e sendo o desvio de 0,070.

A partir da análise dos resultados obtidos observou-se que as espécies *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Delonix regia* (flamboyant) apresentam os maiores valores de $\frac{p_i}{p_a}$, indicando uma possibilidade da pressão do CO_2 em Elísio Medrado ser menor que nas outras cidades analisadas.

Segundo Martinelli et al. (2009) quando a intensidade de luz é alta a planta permanece com seus estômatos mais fechados, diminuindo a concentração de p_i e, portanto, com menor quantidade de luz os estômatos estão mais abertos fazendo com que a relação p_i/p_a aumente. Em locais onde a abundância de luz é menor e não há restrição de água, as plantas tendem a ter valores menores de $\delta^{13}\text{C}$.

Finalmente, usando o valor a , que é estimado em $4,4\text{‰}$, e b estimado em cerca de 30‰ , na equação abaixo:

$$\delta^{13}\text{CO}_2 = \delta^{13}\text{C}_{\text{planta-C3}} + 19,8$$

Estimamos o valor do $\delta^{13}\text{CO}_2$ atmosférico para as diferentes espécies C3 estudadas: *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) nas três cidades escolhidas para estudo, mostrado na *Figura 28*.

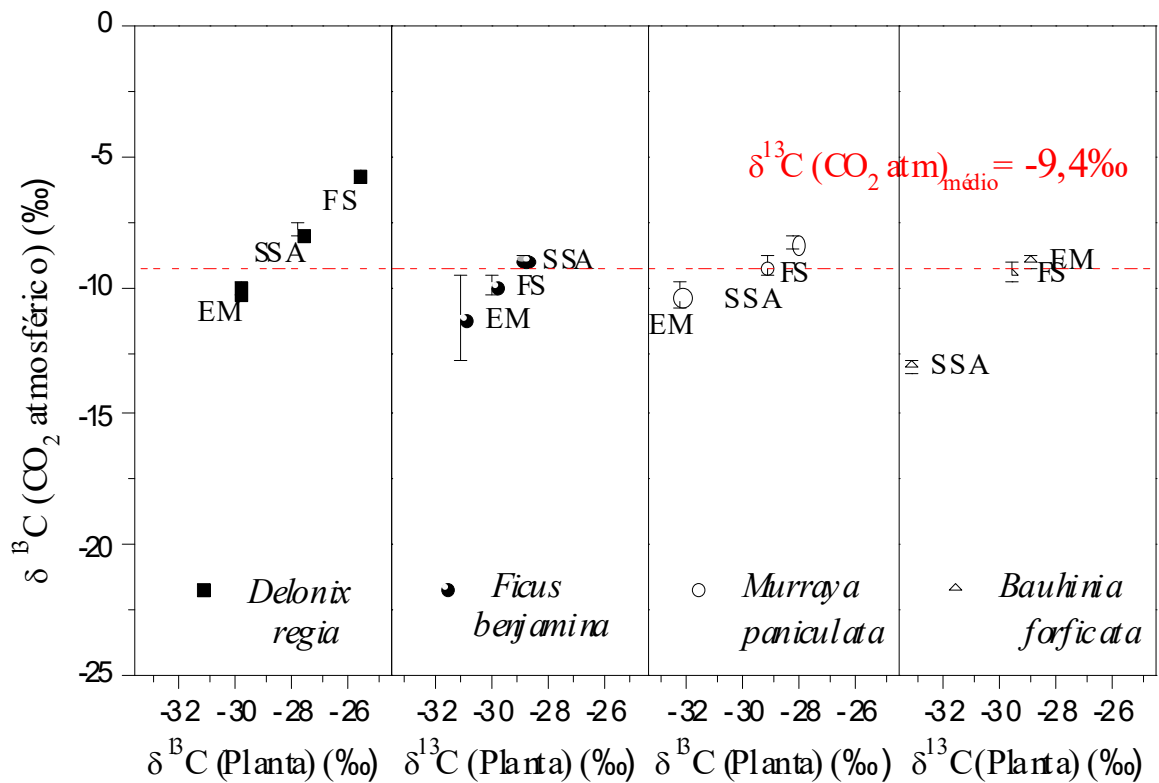


Figura 28: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosf\u00e9rico calculados para esp\u00e9cies de plantas C3: as esp\u00e9cies *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant)

Em um trabalho realizado pela an\u00e1lise de bolhas de ar presas no gelo da Ant\u00e1rtica (Friedli et al., 1986) e medidas diretas de CO_2 e $\delta^{13}\text{C}$, foi poss\u00edvel construir a varia\u00e7\u00e3o hist\u00f3rica desses dois par\u00e2metros. (Martinelli et al. 2009) (Figura 29).

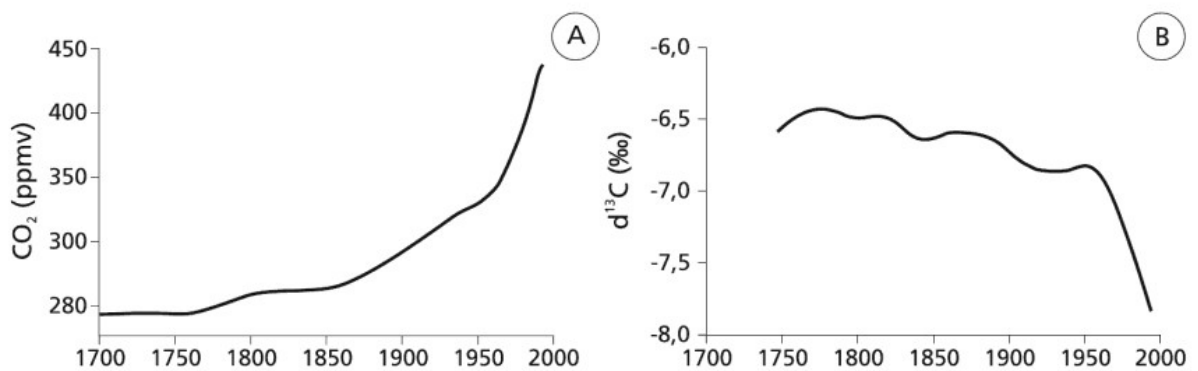


Figura 29: Varia\u00e7\u00e3o temporal (secular) na concentra\u00e7\u00e3o do CO_2 atmosf\u00e9rico (A) e dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosf\u00e9rico (B). Fonte: Martinelli (2009).

Comparando o valor médio do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosférico calculados para espécies de plantas C3, *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) encontrado nesse trabalho com o valores mais atuais encontrado na literatura (Graven et al, 2017, Martinelli et al, 2007) , verifica-se, através de uma extrapolação, que o valor encontrado neste trabalho é mais empobrecido (aproximadamente entre 1 - 2 ‰) que o valor ilustrado por Martinelli (2009), na Figura 29, e outro trabalho mais recente na literatura que apresenta a mesma tendência (Graven et al, 2017) corroborando valores menores que -8 ‰ para 2015. O valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 -9,4‰, encontrado nesse trabalho, corrobora com a tendência da curva acentuadamente decrescente para valores mais negativos ou empobrecidos.

Os valores isotópicos do $\delta^{15}\text{N}$ estão descritos na Tabela 5, onde assume o valor máximo de 7,8, o valor mínimo de -1,9 e apresenta uma média de 3,4.

Os valores encontrados para valores de $\delta^{15}\text{N}$ estão dentro dos valores ilustrados na figura bimodal (Figura 15) referentes a valores de $\delta^{15}\text{N}$ de folhas de árvores de diversos tipos de vegetação brasileira, [Martinelli, et al (2009)]. Mas estão discrepantes devido aos diferentes aportes de nitrogênios que essas plantas receberam em diferentes locais de coleta.

De acordo com Colleta et al. (2009), os valores de razão C/N de 22 espécies de plantas do tipo C3, do Cerrado brasileiro, variam entre, aproximadamente, 15 e 40. Outra pesquisa, realizada por Ferlian, Wirth e Eisenhauer (2017), coletou 32 espécies de plantas na Alemanha Central, encontrando os valores da razão C/N num intervalo de 14,3 a 43,9. Comparando os valores de C/N encontrados aqui com os valores destes trabalhos, percebe-se que os valores aqui encontrados se encontram na região inferior dos intervalos citados. Em relação ao Carbono Orgânico Total, Nitrogênio Total e razão C/N os valores encontrados estão ilustrados na Tabela 5.

10 – CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

Analisando os resultados encontrados verificou-se que os valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ do material foliar das espécies *Opuntia ficus indica* (palma), *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant) são bastante próximos; no entanto, existe diferença entre uma mesma espécie em diferentes localidades em estudo. Essas diferenças podem estar associadas a vários fatores, não sendo possível identificá-los com precisão nesse trabalho, como: níveis de poluição, disponibilidade de água ou luminosidade. Entretanto, como se trata de plantas urbanas e, em relação a luminosidade solar quase equivalentes bem como à disponibilidade de água, sugere-se que essas discrepâncias se devem ao fato dos diferentes aportes de CO_2 disponíveis diferentemente para as mesmas espécies em regiões diversas.

Comparando o valor médio do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosférico calculados para espécies de plantas C3, *Ficus benjamina* (figueira benjamim), *Murraya paniculata* (murta-dos-jardins), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Delonix regia* (flamboyant), o valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 -9,4‰ encontrado nesse trabalho corrobora com valores e com a tendência acentuadamente mais empobrecido.

Os valores do $\delta^{15}\text{N}$ são bem discrepantes, mesmo dentro da mesma espécie, provavelmente devido aos diferentes aportes de nitrogênios que essas plantas receberam foram diferentes, variando de -2,0‰ a +7,0‰..

Como perspectivas pretende-se em medir o valor do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosférico, bem como avaliar essas plantas aumentando-se a amostragem, como também ampliando as análises para outras espécies inclusive para plantas transgênicas.

11 – REFERÊNCIAS

Alves, B. J. R.; Zotarelli, L.; Jantalia; C. P., Boddey; R. M.; Urquiaga, S. **Emprego de Isótopos Estáveis para o Estudo do Carbono e do Nitrogênio no Sistema Solo-Planta**. In: AQUINO, A.M. & ASSIS, R.L., eds. *Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília, Embrapa-SCT, 2005. p.343-350.

Bender, M. M. **Variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation**. *Phytochemistry*, v; 10, n. 6, p. 1239 – 1244, 1971.

Bender, M.M. **Mass spectrometric studies of carbon-13 variations in corn and other grasses**. *Radiocarbon* 10: 468–472, 1968.

Berto, D.; Rampazzo, F.; Gion, C.; Noventa, S. Formalewicz, M.; Ronchi, F.; Traldi, U., Giorgi, G. **Elemental Analyzer/Isotope Ratio Mass Spectrometry (EA/IRMS) as a Tool to Characterize Plastic Polymers in a Marine Environment, Plastics in the Environment**. Alessio Gomiero, IntechOpen, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.81485.

Bianchi, T.; Canuel, E. **Chemical biomarkers in aquatic ecosystems**, Princeton University Press, New Jersey, 2011.

Bowling D.R.; Pataki, D. E.; Randerson, J. T. **Carbon isotopes in terrestrial ecosystem pools and CO₂ fluxes**. *New Phytol.* 2008; **178**: 24-40

Bowling D.R.; Sargent, S. D.; Tanner, B. D.; Ehleringer, J. R. **Tunable diode laser absorption spectroscopy for stable isotope studies of ecosystem-atmosphere CO₂ exchange**. *Agri. Forest Meteorol.* 2003; **118**: 1-19

Bowling D.R.; Tans, P. P.; Monson R. K. **Partitioning net ecosystem carbon exchange with isotopic fluxes of CO₂**. *Global Change Biol.* 2001; **7**: 127-145

Brugnoli E.; Farquhar G.D. **Photosynthetic fractionation of carbon isotopes**. In: Leegood R.C. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, 2000: 399-434

Brugnoli E.; Hubick, K. T.; Caemmerer, S. C.; Wong, S. C. **Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C₃ plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide**. *Plant Physiol.*; **88**: p. 1418-1424, 1988

Clark, I.; Fritz, P. **Environmental Isotopes in Hydrology**, vol. II, Lewis Press, New York, 1997.

Caxito, F. A.; Silva, A. V. **ISÓTOPOS ESTÁVEIS: FUNDAMENTOS E TÉCNICAS APLICADAS À CARACTERIZAÇÃO E PROVENIÊNCIA GEOGRÁFICA DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS**. *Geonomos*, 23(1), 10-17, 2015.

Coletta, L. D.; Nardoto, G. B.; Latansio-Aidar, S. R.; Rocha, H. R.; Aidar, M. P. M.; Ometto, J. P. H. B. **Isotopic view of vegetation and carbon and nitrogen cycles in a cerrado ecosystem, southeastern Brazil**. *Sci. agric. (Piracicaba)*, v. 66, n 4, p. 467-475, 2009.

Costa, A. B. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ISOTÓPICA DE MATERIAL ORGÂNICO EM SEDIMENTOS DA BAÍA DE TODOS OS SANTOS – BA [TESE]**. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2006

Craig, H. **The geochemistry of the stable carbon isotopes**, *Geochimica Cosmochimica Acta Journal*, 1953; 3:53-92

Craig, H. **Carbon-13 in plants and the relationship between carbon- 13 and carbon- 14 variations in nature**. *J. Geol.* 1954; 62: 1 15-49

Dawson T. E.; Mambelli, S.; Plamboeck, A. H.; Templer, P. H.; Tu, K. P. **Stable isotopes in plant ecology**. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2002; **33**: 507-559

Doria, R. N. **CARACTERIZAÇÃO ISOTÓPICA DE ÁGUAS E SEDIMENTOS DE FUNDO E EM SUSPENSÃO NO COMPLEXO ESTUARINO DE CARAVELAS - NOVA VIÇOSA (BA-BRASIL)** [Dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2013

Duranceau, S.; Anderson, R.; Teegarden, R. **Comparison of mineral acid pretreatments for sulfide removal. Journal American Water Works Association - J AMER WATER WORK ASSN.** 91. p. 85-96, 1999. DOI: 10.1002/j.1551-8833.1999.tb08637.x.

Ehleringer, J. R.; Bowling, D. R.; Flanagan, L. B.; Fessenden, J.; Martinelli, L. A.; Ometto, J. P. **Stable Isotopes and Carbon Cycle Processes in Forests and Grassland.** Plant biol. 4, New York, 4, p. 181 – 189, 2002.

Ehleringer, J.; Hall A., Farquhar G. **Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations.** 1. ed., Cambridge, Academic Press, 1992.

Ehleringer, J.; Flanagan, L. **Carbon Isotope Ratios in Belowground Carbon Cycle Processes.** Ecological Applications, v. 10, 2000. DOI: 10.1023/102307/2641103.

Ehleringer, J.; Cook, C. **Carbon and oxygen isotope ratios of ecosystem respiration along an Oregon conifer transect: Preliminary observations based on small-flask sampling.** Tree physiology. n. 18. p. 513-519, 1998. DOI: 10.1093/treephys/18.8-9.513.

Emrich, K.; Ehleringer, J. R.; Vogel, J. C. **Carbon isotope fractionation during the precipitation of calcium carbonate.** Earth Planet. Sci. Lett. 1970, 8:363-71.

Farquhar G. D.; Ehleringer, J. R., Hubick, K. T. **Carbon isotope discrimination and photosynthesis.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1989; 40: 503-537

Farquhar G. D.; Richards R. **Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes.** *Aust. J. Plant Physiol.* 1984; 11: 539-552.

Farquhar, G. **On the Nature of Carbon Isotope Discrimination in C4 Species.** *Australian Journal of Plant Physiology.* 10. 205-226. 1983.

Ferlian, O.; Wirth, C.; Eisenhauer, N. **Leaf and root C-to-N ratios are poor predictors of soil microbial biomass C and respiration across 32 tree species.** *Pedobiologia (Jena).* 65, 16-23, 2017.

Ferreira, A. I. A. J. V. **ESPECTROMETRIA DE MASSA DE RAZÕES ISOTÓPICAS** [Tese]. Lisboa: Universidade de Lisboa – Faculdade de Ciências – Departamento de química e bioquímica, 2008

Ferretti, D. Lowe, D.C.;. **A new gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometry technique for high-precision, N₂O-free analysis of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ in atmospheric CO₂ from small air samples.** *Journal of Geophysical Research.* n. 105. p. 6709-6718, 2000. DOI: 10.1029/1999JD901051.

Fry, B. **Stable Isotope Ecology.** Springer, Berlin, 2006. DOI: 10.1007/0-387-33745-8.

Ghashghaie, J., Badeck, F. W.; Lanigan, G.; Nogués, S.; Tcherkez, G.; Deléens, E.; Cornic, G.; Griffiths, H. **Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C3 plants.** *Phytochemistry Reviews* 2: 145–161, 2003.

Graven, H.; Allison, C. E.; Etheridge, D. M.; Hammer, S.; Keeling, R. F.; Levin, I.; Meijer, H. A. J.; Rubino, M.; Tans, P. P.; Trudinger, C. M.; Vaughn, B. H.; White, J. W. C. **Compiled records of carbon isotopes in atmospheric CO₂ for historical simulations in CMIP6.** *Geosci. Model Dev.*, 10, 4405 – 4417, 2017.

Guy, R. D; Fogel, M. F; Berry, J. A; Hoering, T . C. **Isotope fractionation during oxygen production and consumption by plants.** In Progress in Photosynthetic Research III, 1987, ed. J. B iggins, pp. 597-600. Dordrecht: Martinus Nijhoff.

Hatch, M. D.; Slack, C. R. **Photosynthesis in sugarcane leaves: a new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation.** Biochem J 101: p. 103–111, 1966.

Hattersley, P. W. **$\delta^{13}\text{C}$ values of C₄ types in grasses.** Australian Journal of Plant Physiology, v. 9, p. 139-54, 1982

Hanba, Y., Mori, Shigeta.; Lei, T. T.; Koike, T.; Wada, E. **Variations in leaf $\delta^{13}\text{C}$ along a vertical profile of irradiance in a temperate Japanese forest.** Oecologia, 110, p. 253 – 261, 1997.

Hayes, J. M. **Fractionation of the Isotopes of Carbon and Hydrogen in Biosynthetic Processes.** Apresentado em: National Meeting of the Geological Society of America, Boston, MA, 2-4, 2001.

Hayes, J. **Factors controlling ^{13}C contents of sedimentary organic compounds: Principles and evidence,** Marine Geology, n. 113: p. 111-125, 1993.

Hoefs, Jochen. **Stable isotope geochemistry.** 6^a ed., 2009. DOI: 10.1007/978-3-540-70708-0.

Högberg, P. **^{15}N natural abundance in soil–plant systems.** Tansley Review No. 95. New Phytologist. n. 137, p. 179 – 203, 1997. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1997.00808.x.

Keeling, C. D. **The concentration and isotopic abundances of atmospheric carbon dioxide in rural areas.** Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 13, p. 322-34, 1958.

Kohn, M. J. **Carbon isotope compositions of terrestrial C₃ plants as indicators of (paleo)ecology and (paleo)climate.** PNAS, vol. 107, no. 46, 19691–19695, 2010.

Khon, M. J. **Carbon isotope compositions of terrestrial C3 plants as indicators of (paleo)ecology and (paleo)climate.** Proceedings of the National Academy of Sciences, Nov 2010, 107 (46), p. 19691-19695; DOI: 10.1073/pnas.1004933107

Korner, C. H.; FARQUHAR, G. D.; WONG, S. C. **Carbon isotope discrimination by plants follows latitudinal and altitudinal trends.** Oecologia, v. 88, p. 30-40, 1991.

Kortschak, H. H., Constance B. G. **Carbon Dioxide Fixation in Sugarcane Leaves. Plant physiology.** 40. 209-13, 1965.

Lin, G.; Ehleringer, J. R. **Carbon Isotopic Fractionation Does Not Occur during Dark Respiration in C3 and C4 Plants.** Plant Physiology, 1997, n 114 p. 391-394; DOI: 10.1104/pp.114.1.391

Martinelli, L. A. Ometto, J. P. H. B.; Ferraz, E. S.; Victoria, R. L.; Camargo, P. B.; Moreira, M. Z. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis** - São Paulo: Oficina de Textos, 2009.

Martinelli, L. A.; Piccolo, M. C.; Townsend, A. R.; Vitousek, P. M.; Cuevas, E.; McDowell, W.; Robertson, G. P.; Santos, O. C.; Treseder, K. **Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: tropical versus temperate forests.** Biogeochemistry, v. 46, p. 45-65, 1999.

McKiney, C.; McRae, J.; Epstein, S.; Allen, H. e Urey, H. **Improvements in mass spectrometers for the measurements of small differences in isotopes abundance ratios,** Review of Scientific Instruments, n. 21: p. 724-730, 1950.

Medina, E.; Martinelli, L. A.; Barbosa, E. Victoria, R. L. **Natural abundance of ¹³C in tropical grasses of northern Brazil.** Revista Brasileira de Botânica, v. 22, p. 43-51, 1999

Meyers, P. **Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter**, *Chemical Geology*, n. 114: p. 289-302, 1994.

Meyers, P. **Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes**, *Organic Geochemistry*, 27, p. 213-250, 1997.

Mook W. G.; Vries J. J. **Environmental Isotopes in the Hydrological Cycle: Principles and Applications**. vol. 1, International Agency of Atomic Energy. 2001.

Mook, W. G; Bommerson, J. C; Staverman, W . H. **Carbon isotope fractionations between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide**. *Earth Planet Sci. Lett.* 1974, 22: 1 69-76.

Mozeto, A. A.; Nogueira, F. M.; Souza, M. H. A.; Victoria, R. L. **C₃ and C₄ grasses distribution along soil moisture gradient surrounding areas of the Lobo Dam (São Paulo, Brazil)**. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 68, p. 113-21, 1996

O'Leary, M. **Biochemical basis of carbon isotope fractionation**. In: EHLERINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. (Eds). *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. San Diego: Academic Press Inc, 1993. p. 19-26.

O'Leary, M. H. **Carbon Isotopes in Photosynthesis: Fractionation techniques may reveal new aspects of carbon dynamics in plants**. *BioScience*, Volume 38, Issue 5, 1988, Pages 328–336, <https://doi.org/10.2307/1310735>.

O'Leary, M. H.; Reife, J. E . , Slater, J. D. **Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase**. *Biochemistry*, 1981; 20:7308--1 4.

O'Leary, M. H. **Measurement of the isotopic fractionation associated with diffusion of carbon dioxide in aqueous solution**. *J. Phys. Chem.* 1984; 88:823-25.

Ogée J.; Peylin, P.; Cuntz, M.; Bariac, T.; Brunet, Y.; Berbigier, P. R.; Richard, P.; Ciais, P. **Partitioning net ecosystem carbon exchange into net assimilation and respiration with canopy-scale isotopic measurements: an error propagation analysis with $^{13}\text{CO}_2$ and CO^{18}O data.** *Global Biogeochem. Cycles.* 2004; **18**: 2019-2035

Oliveira, E. **A pequena cidade de Elísio Medrado-BA e sua inserção na rede urbana.** [Monografia]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2010.

Park, P., Epstein, S. **Carbon isotope fractionation during photosynthesis.** *Geochimica et cosmochimica acta*, v. 21, n. 1-2, p. 110 – 126, 1960.

Park, R. & Epstein, S. (1961). **Metabolic fractionation of ^{12}C and ^{13}C in plants.** *Plant Physiol.* 36, 133.

Pereira, A. L.; Benedito, E. **Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas.** *Rev. biociên., Taubaté*, v.13, n.1-2, p.16-27, jan/jun. 2007

Popp, B. N.; Laws, E. A.; Bidigare, R. R.; Dore, J. E.; Hanson, K. K.; Wakeham, S. G. **Effect of phytoplankton cell geometry on carbon isotopic fractionation.** *Geochimica et cosmochimica acta*, v. 62, n. 1, p. 69-77, 1998.

Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. **Biologia vegetal.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996. 728p.

Reibach, P. H. . , Benedict, C. R. **Fractionation of stable carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C4 plants.** *Plant Physiol.* 1977; 59:564- 68

Ribas-Carbo, M.; Taylor, N. L.; Giles, L.; Busquets, S.; Finnegan, P. M.; Day, D. A.; Lambers, H.; Medrano, H.; Berry, J. A.; Flexas, J. **Effects of Water Stress on Respiration in Soybean Leaves.** *Plant physiology.* n. 139. p. 466-73, 2005. DOI: 10.1104/pp.105.065565.

Roeske, C. A. , O'leary, M. H. **Carbon isotope effects on the enzymecatalyzed carboxylation of ribulose biphosphate.** *Biochemistry*, 1984; 23:6275- 84

Rounick, J. S. e Winterbourn, M. J. **Stable carbon isotopes and carbon flow in ecosystems.**, *BioScience*, n. **36**(3): p. 171–177, 1986.

Schulz, H. e Zabel, M. **Marine Geochemistry**, 2nd revised, Editora Springer, Germany, 2006.

Schleser, G. H., Jayasekera, R. **$\delta^{13}\text{C}$ -variations of leaves in forests as an indication of reassimilated CO_2 from the soil.** *Oecologia*, n. 65, p. 536–542, 1985.
<https://doi.org/10.1007/BF00379669>

Smith, B. N., Epstein, S. **Two Categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios for Higher Plants.** *Plant Physiol* 47, 380-384, 1971.

Smith, N. B.; Epstein, S. **Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higer plants.** *Plant Physiology*, v. 47, p. 380-84, 1971

Souza, J. R. B. **AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ISOTÓPICAS E MOLECULARES ATRAVÉS DE MARCADORES GEOQUÍMICOS DAS FONTES E DISTRIBUIÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA SEDIMENTAR NA BAÍA DE TODOS OS SANTOS** [Tese]. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2015

Sternberg, L. S. L.; MULKEY, S. S.; WRIGHT, S. J. **Ecological interpretation of leaf carbon isotope ratios: influence of respired carbon dioxide.** *Ecology*, n. 70: p. 1317-1324, 1989.

Tcherkez, G; Mahé, A.; Hodges, M. **$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ fractionations in plant primary metabolism.** *Trands in plant science*, Volume 16, Issue 9, September 2011, Pages 499-506 .

Tomasoni, M. A.; Santos, S. D. **Lágrimas da serra: os impactos das atividades agropecuárias sobre o geossistema da APA municipal da Serra da Jibóia, no município de Elísio Medrado – BA.** In: livro de resumos do X simpósio brasileiro de geografia física aplicada, p. 1385-1393, 2003.

Trolier, M.; White, J. W. C.; Tans, P. P.; Masarie, K. A.; Gemery, P. A. **Monitoring the isotopic composition of atmospheric CO₂: Measurements from the NOAA Global Air Sampling Network.** Journal of Geophysical Research. n. 1012. p. 25897-25916, 1996. DOI: 10.1029/96JD02363.

Victoria, R. L.; Fernandes, F.; Martinelli, L. A.; Piccolo, M. C.; Camargo, P. B.; Trumbore, S. **Past vegetation changes in the Brazilian Pantanal arboreal-grass savanna Ecotone by using carbon isotopes in the soil organic matter.** Global Change Biology, v. 1, p. 101-108, 1995.

Wickman, F. E. **Variations in the abundance of the carbon isotopes in plants.**; Geochimica et Cosmochimica Acta. V.2, p.243-254, 1952

Yakir D., Sternberg S.L. **The use of stable isotopes to study ecosystem gas exchange.** *Oecologia*. 2000; **123**: 297-311

Zerfas, G. S. A.; Sánchez, F. J. S.; Júnior, F. C. **Aplicação de métodos isotópicos e numéricos em paleoceanografia com base em foraminíferos planctônicos,** TERRAE DIDACTICA 7(1):4-17, 2011.