



Julianna Maria de Almeida Martins

**Espectroscopia de cavidade ressonante do
tipo “*ring-down*” (CRDS) como ferramenta
para a determinação da distribuição
isotópica de carbono**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientadores: Prof. José Marcus de Oliveira Godoy
Coorientadora: Dra. Gisele Birman Tonietto

Rio de Janeiro
Abril de 2012



Julianna Maria de Almeida Martins

**Espectroscopia de cavidade ressonante do
tipo “*ring-down*” (CRDS) como ferramenta
para a determinação da distribuição
isotópica de carbono**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela
Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. José Marcus de Oliveira Godoy
Orientador
Departamento de Química - PUC-Rio

Dr^a Gisele Birman Tonietto
Coorientadora
PUC-Rio

Dr. Arthur de Lemos Scofield
Sem Vínculo

Prof^a Maria Isabel Pais da Silva
Departamento de Química - PUC-Rio

Dr^a Aída Pereira Baêta
Sem Vínculo

Prof. José Eugenio Leal
Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 24 de abril de 2012

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Julianna Maria de Almeida Martins

Graduada em Química Bacharelado pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro em 2009.

Ficha Catalográfica

Martins, Julianna Maria de Almeida

Espectroscopia de cavidade ressonante do tipo “ring-down” (CRDS) como ferramenta para a determinação da distribuição isotópica de carbono / Julianna Maria de Almeida Martins ; orientador: José Marcus de Oliveira Godoy ; coorientadora: Gisele Birman Tonietto. – 2012.

107 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2012.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Análise isotópica. 3. Espectroscopia a laser. 4. Carbono. 5. Biomassa. 6. Bio-óleo. 7. Biocombustível. 8. Etanol. 9. Açúcar. I. Godoy, José Marcus de Oliveira. II. Tonietto, Gisele Birman III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

“As melhores e mais belas coisas da vida não podem ser vistas,
nem tocadas, devem ser sentidas com o coração”
Hellen Keller

Agradecimentos

Ao meu orientador, José Marcus de Oliveira Godoy, e à minha coorientadora Gisele Birman Tonietto, pelo suporte e pelos conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

À professora Maria Isabel Pais da Silva e ao Dr. Arthur de Lemos Scofield pelas amostras concedidas.

Ao Dr. Nabil Saad pelo auxílio em relação ao CRDS.

A todos os componentes do LABAGUAS, principalmente Walquíria e Mara, pela ajuda durante o trabalho e pelas palavras de incentivo.

Ao pessoal do LABMAM pelo empréstimo de equipamentos.

A todos os amigos da Pós, Ricardo, Raquel, Rachel, Letícia, Claudia, Jennifer, Vinícius, Camila, Gilberto, Wellington, Lucas, Alcindo, Ana Paula, Cristiane, Cristiana, Thaísa, Cibele e Gilson pela ajuda, companheirismo, amizade, e paciência em ouvir queixas e lamentações.

À Jennifer por todo incentivo e amizade.

À Guria, por todos os dias em que ficamos até tarde na faculdade dissertando, dando apoio uma à outra.

À Laurinha e Mônica Vianna pela ajuda e atenção.

Ao monstro Totoro, à Felícia e à Rachel pelos divertidos momentos de descontração.

Ao professor Maurício Leonardo Torem pelas palavras de incentivo.

A todos da secretaria do Departamento de Química por todo o auxílio e amizade.

Ao Norberto e ao Douglas pelos momentos de desabafo.

À Zuzu pelo lanche da tarde.

À minha mãe Fátima, e ao meu marido Ivair, pela compreensão, incentivo e paciência.

À minha amiga Priscila por entender a minha completa ausência durante o período do mestrado.

Ao pessoal do TKD pelos momentos de descontração.

Ao CNPq, PUC-Rio e Petrobrás pelos auxílios concedidos, fundamentais para a realização deste trabalho.

Resumo

Martins, Julianna Maria de Almeida; Godoy, José Marcus de Oliveira; Tonietto. **Espectroscopia de cavidade ressonante do tipo “ring-down” como ferramenta para a determinação da distribuição isotópica de carbono.** Rio de Janeiro, 2012. 107p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A análise isotópica vem crescendo a cada ano devido à sua grande área de atuação nas diversas áreas da ciência. Existem diversas técnicas utilizadas para realizar a determinação das concentrações naturais dos isótopos e suas variações, sendo que a mais utilizada é a espectrometria de massa de razões isotópicas (EMRI). Uma técnica analítica que vem ganhando espaço no mercado é a espectroscopia de cavidade ressonante do tipo *ring-down* (ECRRD) (*Cavity Ring-Down Spectroscopy - CRDS*), que é uma técnica baseada em laser. Ao contrário dos espectrômetros de massa, estes analisadores exigem pouco ou nenhum tratamento da amostra, diminuindo com isso o tempo de análise. O presente trabalho tem como objetivo obter a assinatura isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em amostra sólidas e líquidas, empregando um analisador a laser. Foi desenvolvido e implementado um método de análise isotópica empregando um analisador de carbono orgânico total acoplado a um espectrômetro de cavidade ressonante do tipo *ring-down* (*i*TOC-CRDS). Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos através de um EMRI. O desempenho do método foi avaliado através dos parâmetros de linearidade; exatidão, pela utilização de materiais de referência certificados; precisão, pela repetitividade e reprodutibilidade; além dos cálculos das incertezas associadas. Foram analisadas amostras de açúcar, biomassas, bio-óleo, biocombustível, metanol e gasolina.

Palavras-chave

Análise isotópica; espectroscopia a laser; carbono; biomassa, bio-óleo, biocombustível; etanol; açúcar; gasolina; metanol.

Abstract

Martins, Julianna Maria de Almeida; Godoy, José Marcus de Oliveira; Tonietto (Advisor). **Cavity ring-down spectroscopy as a tool for the determination of carbon isotope distribution.** Rio de Janeiro, 2012. 107p. MSc. Dissertation - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The use of isotopic analyses grows each year, due to large area of expertise in several science areas. Several techniques are used to perform the determination of natural isotope concentrations and their variations, with isotopic ratio mass spectroscopy (IRMS) being the most widely used. An analytical technique that is gaining market space is the cavity ring-down spectroscopy. Unlike mass spectrometers, these analyzers require little or no sample treatment, thereby reducing the analysis time. The present study aimed to obtain the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic signature in solid and liquid samples using a laser analyzer. An isotopic analysis method using a total organic carbon analyzer coupled to a cavity ring-down spectrometer (*i*TOC-CRDS) was developed and implemented. The results were compared with those obtained by IRMS. The method performance was evaluated by the parameters of linearity; accuracy, using standard reference materials; precision, using parameters of repeatability and reproducibility and by calculating the associated uncertainties. The analyzed samples were sugar, biomass, bio-oil, biofuel, methanol and gasoline.

Keywords

Isotopic analysis; laser spectroscopy; carbon; biomass; bio-oil; biofuel; methanol; sugar; gasoline; methanol.

Sumário

1	Introdução	19
1.1.	Isótopos	19
1.2.	Isótopos Estáveis	19
1.2.1.	Carbono	21
1.3.	Análise Isotópica de Isótopos Estáveis	22
1.4.	Termos e Definições	23
2.	Objetivos	26
2.1.	Objetivo Geral	26
2.2.	Objetivos Específicos	26
3.	Condições Gerais	27
4.	Amostras	35
4.1	Biomassas	35
4.1.1.	Plantas dos Ciclos Fotossintéticos C3 e C4	36
4.1.1.1.	Fracionamento pelas plantas C3	37
4.1.1.2.	Fracionamento pelas plantas C4	38
4.2.	Biocombustíveis	40
4.2.1.	Etanol	42
4.3.	Açúcar	45
4.4.	Metanol	45
4.5.	Gasolina	46
5.	Técnicas Utilizadas na Análise Isotópica	47
5.1.	Espectrometria de Massas de Razões Isotópicas (EMRI)	47
5.2.	Espectroscopia de Cavidade Ressonante Tipo Ring-Down (ECRRD)	51
5.2.1.	Breve Histórico	51
5.2.2.	Princípios de Operação do ECRRD	53

5.2.2.1. Princípio de Operação do equipamento ITOC-CRDS	55
5.2.2.1.1. Princípio de Operação do Módulo de Análises de Amostras Líquidas (Modelo: OI Analytical Aurora 1030W)	56
5.2.2.1.2. Princípio de Operação do Módulo de Análises de Amostras Sólidas (Modelo: OI Analytical Solids 1030S)	57
6. Materiais e Métodos	59
6.1. Materiais	59
6.2. Reagentes	59
6.3. Instrumentação e Equipamentos	59
6.4. Planejamento Experimental	60
6.5. Metodologia	60
6.5.1. Condições Operacionais	60
6.5.2. Calibração do Espectrômetro de Cavidade Ressonante do Tipo <i>Ring-Down</i> Picarro G1101- <i>i</i>	61
6.5.3. Critérios de Desempenho da Metodologia Analítica	62
6.5.3.1. Linearidade	62
6.5.3.2. Precisão	62
6.5.3.2.1. Repetitividade	63
6.5.3.2.2. Reprodutibilidade	63
6.5.3.3. Exatidão	63
6.5.3.3.1. Materiais de Referência Certificados (MRC's)	63
6.5.3.3.2. Comparação da Precisão entre Métodos	65
6.5.3.4. Incerteza de Medição	66
6.5.4. Amostragem e Preservação	69
6.5.5. Análise das Biomassas e do Bio-óleo	69
6.5.6. Análise do Biocombustível	70
6.5.7. Análise de Açúcar	70
6.5.8. Análise de Metanol	71
6.5.9. Análise de Gasolina Comum	72
7. Resultados e Discussões	73
7.1. Planejamento Experimental	73
7.2. Critérios de Desempenho da Metodologia Analítica	77

7.2.1. Linearidade	77
7.2.2. Precisão	81
7.2.2.1. Repetitividade	81
7.2.2.2. Reprodutibilidade	81
7.2.3. Exatidão	83
7.2.3.1. Materiais de Referência Certificados (MRC's)	83
7.2.3.2. Comparação Interlaboratorial	84
7.2.4. Incertezas de Medições	85
7.3. Análise de Amostras Reais	89
7.3.1. Biomassas e Bio-óleo	89
7.3.2. Biocombustível	89
7.3.3. Açúcar	90
7.3.4. Metanol	90
7.3.5. Gasolina Comum	90
8. Conclusões	92
9. Referências Bibliográficas	94
10. Apêndice	104
10.1. Dados Utilizados no Planejamento Experimental	104
10.2. Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Bagaço de Cana	105
10.3. Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Capim Elefante	105
10.4. Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Lignina	106
10.5. Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Serragem	106
10.6. Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Bio-óleo de Serragem	107

Lista de figuras

Figura 1- Evolução de artigos publicados na última década (Fonte: Banco de dados Science Direct e Web of Science)	22
Figura 2 - Relação entre resultados positivos e negativos de amostras com o isótopo de carbono mais pesado (^{13}C) (adaptado de Nogueira, 2008)	25
Figura 3 - representação esquemática das mudanças nos valores de $\delta(^{13}\text{C})$ (adaptado de Baskaran, 2011)	25
Figura 4 - Alguns exemplos típicos de valores de $\delta(^{13}\text{C})$ agrupados segundo sua origem ao longo da escala de abundância natural de C. (adaptado de Meier-Augestein, 1999)	34
Figura 5 - Rota bioquímica da síntese de carboidratos em plantas C3, Ciclo de Calvin-Benson (Fonte: Nogueira, 2008)	37
Figura 6 - Rota bioquímica da síntese de carboidratos em plantas C4, Ciclo de Hatch-Slack (Fonte: Nogueira, 2008)	39
Figura 7 - Enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) do CO_2 atmosférico, das plantas C3 e das plantas C4 (adaptado de Nogueira, 2008)	39
Figura 8 - Crescimento médio anual da capacidade de energia renovável e produção de biocombustíveis (adaptado de REN21, 2011)	40
Figura 9 - Distribuição do uso das principais fontes energéticas (adaptado de REN21, 2011)	41
Figura 10 - A evolução dos biocombustíveis no Brasil (Fonte: ANP)	42
Figura 11 - Produção mundial de etanol e biodiesel no período de 2000 a 2010 (adaptado de REN21, 2011)	44
Figura 12 - Representação esquemática de um sistema com dupla entrada para determinações isotópicas precisas (adaptado de Brand, 1996)	49
Figura 13 - Diagrama esquemático de um analisador elementar acoplado a um espectrômetro de massas de razões isotópicas (AE-EMRI) (adaptado de Kelly, 2002)	49

Figura 14 - Representação esquemática de um CG-EMRI trabalhando em modo de fluxo contínuo. (adaptado de Baskaran, 2012)	51
Figura 15 - Esquema experimental de um CRDS (adaptado de Berden, 2000)	52
Figura 16 - Esquema operacional baseado no modelo utilizado por O'Keefe e Deacon em 1988 (adaptado de Paul e Saykally, 1997)	52
Figura 17 - Esquema dos quatro tipos mais comuns de CRDS (adaptado de Berden e Engeln, 2009)	53
Figura 18 - Diagrama de bloco dos componentes básicos de um esquema CRDS (adaptado de Crosson, 2008)	54
Figura 19 - a) Sequencia temporal dos pulsos deixando a cavidade, quando esta está vazia. b) Sequencia temporal deixando a cavidade quando se adiciona um gás absorvente à cavidade (adaptado de Crosson, 2008)	55
Figura 20 - Intensidade da luz vista pelo fotodetector, quando o laser é desligado, em dois diferentes momentos, primeiro quando a cavidade se encontra vazia e num outro momento quando há amostra na cavidade (adaptado de Crosson, 2008)	55
Figura 21 - Princípio de operação – Amostras líquidas (Fonte: OI Analytical Application Note #35190710, 2011)	57
Figura 22 - Princípio de operação – Amostras sólidas (Fonte: OI Analytical Application Note #35190710)	58
Figura 23 - Espinha de peixe (diagrama causa-efeito) para a determinação do $\delta(^{13}\text{C})$	67
Figura 24 - Fluxograma do processo analítico das amostras de biomassa	69
Figura 25 - Fluxograma do processo analítico da amostra de bio-óleo	70
Figura 26 - Fluxograma do processo analítico das amostras de etanol	70
Figura 27 - Fluxograma do processo analítico da amostra de açúcar	71
Figura 28 - Fluxograma do processo analítico das amostras de metanol e gasolina	71

Figura 29 - Fluxograma do processo analítico das amostras de gasolina através do módulo de sólidos	72
Figura 30 - Valores da função de desejabilidade	74
Figura 31 - Valores de CO ₂	74
Figura 32 - Superfície de resposta com TR = 8 minutos	75
Figura 33 - Superfície de resposta com TR = 4 minutos	75
Figura 34 - Valor da função de desejabilidade para as condições operacionais escolhidas para o módulo de líquidos do TOC (OI Analytical Aurora modelo 1030W)	76
Figura 35 - Primeira curva analítica do CRDS	77
Figura 36 - Segunda curva analítica obtida para o CRDS	79

Lista de tabelas

Tabela 1: Abundância natural dos isótopos estáveis dos elementos C,H,O,N e S	20
Tabela 2: Razão Isotópica absoluta dos MRC's internacionais	24
Tabela 3: Fatores biológicos e ambientais que influenciam no valor de $\delta(^{13}\text{C})$ (‰) de plantas C3 e C4	36
Tabela 4: Condições operacionais do π TOC-CRDS para a análise de amostras no módulo de sólidos (OI Analytical Solids modelo 1030S)	42
Tabela 5: Condições operacionais do π TOC-CRDS para a análise de amostras no módulo de líquidos (OI Analytical Aurora modelo 1030W)	61
Tabela 6: MRC's utilizados	64
Tabela 7: Dados obtidos para as condições operacionais do módulo de líquidos do TOC (OI Analytical Aurora modelo 1030W)	76
Tabela 8: Dados obtidos para a primeira curva de calibração do CRDS	77
Tabela 9: Estatística de regressão	78
Tabela 10: Estatística de regressão desconsiderando o valor do intercepto	78
Tabela 11: Estatística de regressão desconsiderando o valor do intercepto (continuação)	79
Tabela 12: Dados obtidos para segunda curva de calibração do CRDS	79
Tabela 13: Estatística de regressão da nova curva analítica	80
Tabela 14: Estatística de regressão desconsiderando o valor do intercepto da nova curva analítica	80
Tabela 15: Resultados para avaliação do parâmetro repetitividade	81
Tabela 16: Resultados obtidos através da análise de açúcar para avaliação do parâmetro reprodutibilidade	82
Tabela 17: Resultados obtidos através da análise de etanol para avaliação do parâmetro reprodutibilidade	82
Tabela 18: Resultados obtidos através da análise do metanol da	

marca Mallinckro para avaliação do parâmetro reprodutibilidade	83
Tabela 19: Resultados obtidos para avaliação do índice z (<i>z-score</i>) dos MRC's através do módulo de sólidos do TOC (OI Analytical Solids modelo 1030S)	83
Tabela 20: Resultados obtidos para avaliação do índice z (<i>z-score</i>) dos MRC's através do módulo de líquidos do TOC (OI Analytical Aurora modelo 1030W)	84
Tabela 21: Resultados obtidos através das duas metodologias diferentes	84
Tabela 22: Resultados obtidos através de três laboratórios diferentes	85
Tabela 23: Memória de cálculo das incertezas de medição das amostras de açúcar, etanol, metanol e gasolina	86
Tabela 24: Memória de cálculo das incertezas de medição das amostras de açúcar, etanol, metanol e gasolina (continuação)	87
Tabela 25: Memória de cálculo das incertezas de medição das amostras de biomassa e bio-óleo de serragem.	88
Tabela 26: Resultados obtidos para as amostras de biomassa analisadas.	89
Tabela 27: Resultados obtidos para as amostras de metanol analisadas	90

Lista de abreviaturas e siglas

ACOT-ECRRD	Analisador de Carbono Orgânico Total Acoplado a um Espectrômetro de Cavidade Ressonante do Tipo Ring-Down
AE	Analisador Elementar
AE-EM	Analisador Elementar Acoplado a um Espectrômetro de Massas
AE-EMRI	Analisador Elementar Acoplado a um Espectrômetro de Massas de Razões Isotópicas
AICE	Análise Isotópica de Compostos Específicos
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BARCA	Balanço Atmosférico Regional de Carbono na Amazônia
CAM	Metabolismo Ácido das Crussuláceas
CRD	Cavidade do tipo <i>Ring-Down</i>
CE-EMI	Composto Específico – Espectrometria de Massas de Isótopos
CG	Cromatógrafo Gasoso
CGAE	Cromatógrafo Gasoso de Alta Eficiência
CG-C-ECRRDFC	Cromatógrafo Gasoso com uma Interface de Combustão acoplada a um Espectrômetro de Cavidade Ressonante do Tipo <i>Ring-Down</i> de fluxo contínuo
CG-C-EMRI	Cromatógrafo Gasoso com uma Interface de Combustão acoplada a um Espectrômetro de Massas de Razões Isotópicas
CG-EMRI	Cromatógrafo Gasoso Acoplado a um Espectrômetro de Massas de Razões Isotópicas
CL	Cromatografia Líquida
CID	Carbono Inorgânico Dissolvido
CRDS	<i>Cavity Ring-Down Spectroscopy</i>
DE-EMRI	Dupla Entrada - Espectroscopia de Massas de Razões Isotópicas
ECAI	Espectroscopia de Cavidade de Absorção Intensificada
EALCRRD	Espectroscopia de Absorção a Laser de Cavidade Ressonante do tipo <i>Ring-Down</i>
ECRTRD	Espectrômetro de Cavidade Ressonante do tipo <i>Ring-Down</i>
ECRRD-OC	Espectroscopia de Cavidade Ressonante do tipo <i>Ring-Down</i> de Onda Contínua
ECRRD-DF	Espectroscopia de Cavidade Ressonante do tipo <i>Ring-Down</i> de Deslocamento de Fase
ECRRD-MC	Espectrômetro de Cavidade Ressonante do tipo <i>Ring-Down</i> Acoplado a um Módulo de Combustão
EM	Espectrômetro de Massas
EMPI	Espectroscopia de Massas com Plasma Induzido

EMRI	Espectroscopia de Massas de Razões Isotópicas
EMRIE	Espectrometria de Massas de Razões de Isótopos Estáveis
FC-EMRI	Fluxo Contínuo - Espectroscopia de Massas de Razões Isotópicas
IE-EMRI	Impacto de Elétrons - Espectrometria de Massas de Razão Isotópica
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Proálcool	Programa Nacional do Alcool
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

1 Introdução

1.1. Isótopos

O termo *isótopo* foi introduzido por Frederick Soddy em 1913 para designar as diferentes espécies do mesmo elemento. Sua origem vem do grego *iso* (igual) e *topos* (lugar), referindo-se ao fato que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica (Baskaran, 2011).

São denominados isótopos os átomos de um mesmo elemento químico, que possuam exatamente o mesmo número atômico e diferentes números de massas (Martinelli *et al.*, 2009). Seus núcleos possuem o mesmo número de prótons, mas diferentes números de nêutrons. Apresentam propriedades químicas iguais (possuem o mesmo número de elétrons na eletrosfera) e físicas diferentes (Atkins e Jones, 2006; Tauhata *et al.*, 2003).

Os isótopos são classificados em isótopos estáveis e isótopos instáveis (radioativos). Os isótopos instáveis sofrem decaimento (mudam suas massas) por emissão de energia ou partículas subatômicas, enquanto que os isótopos estáveis não alteram sua massa ao longo de sua existência (Martinelli *et al.*, 2009). A análise isotópica pode ser realizada utilizando tanto isótopos estáveis quanto os radioativos.

1.2. Isótopos Estáveis

Os elementos naturais que constituem os isótopos estáveis não possuem as propriedades de emissão de radiações e são caracterizados pela sua abundância natural (Baskaran, 2011). Os isótopos estáveis passaram a ser utilizados como traçadores ambientais a partir da década de 1930, através do aprimoramento do espectrômetro de massas por Alfred Neir e colaboradores (Berden, 2009; Martinelli *et al.*, 1991).

Nem todos os isótopos ocorrem na natureza em proporções significativas ou mensuráveis. Os isótopos que têm ocorrência natural e que acompanham os ciclos naturais do meio ambiente (ciclo hidrológico, do carbono e outros) são denominados comumente de "ambientais" (Silveira e Júnior, 2002; Martinelli *et al.*, 1991). Os isótopos estáveis ambientais mais importantes em estudos ambientais são os isótopos do carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e enxofre (Silveira e Júnior, 2002; Meier-Augenstein, 1999; Peterson e Fry, 1987).

Normalmente os isótopos com menor massa atômica são os mais abundantes, enquanto os isótopos que possuem massa atômica maior são mais raros. Cada elemento apresenta um isótopo leve dominante: carbono-12, hidrogênio-1, oxigênio-16, nitrogênio-14 e enxofre-32; e um ou mais isótopos pesados: carbono-13, hidrogênio-2, oxigênio-17, oxigênio-18, nitrogênio-15, enxofre-33, enxofre-34 e enxofre-36 (Sleiman *et al.*, 2008).

A diferença do número de massa, característico dos isótopos de um elemento, condiciona comportamentos distintos do elemento em relação a um determinado isótopo, modificando localmente a abundância relativa entre os vários isótopos na natureza, em um processo chamado de fracionamento isotópico. Quanto maior for a diferença de massa entre os isótopos, maior será o fracionamento isotópico. Este fracionamento pode ocorrer devido a mudanças de fase ou estado, diferença na taxa de reação química e diferença na velocidade de difusão molecular (Silveira e Júnior, 2002). A tabela 1 mostra a abundância natural dos isótopos estáveis dos elementos C, H, O, N e S expressa na unidade átomos %.

Tabela 1: Abundância natural dos isótopos estáveis dos elementos C,H,O,N e S.

Isótopo Leve	Átomos %	Isótopo Pesado	Átomos %
¹ H	99,9844	² H	0,0156
¹² C	98,8890	¹³ C	1,1110
¹⁴ N	99,6340	¹⁵ N	0,3660
		¹⁷ O	0,0372
¹⁶ O	99,7628	¹⁸ O	0,2000
		³³ S	0,7500
³² S	95,0180	³⁴ S	4,2150
		³⁶ S	0,0170

Fonte: Nogueira, 2008.

A utilização dos isótopos, anteriormente citados, em estudos ambientais se baseia no fato de que a composição isotópica varia de uma forma previsível, conforme o elemento se move através dos diversos compartimentos de um ecossistema (Silveira e Júnior, 2002). Estas proporções podem ser alteradas durante alguns processos biológicos ou físicos, quando existe competição entre isótopos em um passo determinante de uma reação ou de um processo. Os isótopos mais pesados reagem sempre a uma taxa mais baixa, o que causa uma modificação na distribuição das suas quantidades relativas “normais”, citadas na tabela 1 (Silva, 1999).

A distinção do uso de cada isótopo é função dos objetivos de cada trabalho e os meios de que se dispõe. O presente trabalho visa determinar a assinatura isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do carbono em amostras sólidas e líquidas.

1.2.1. Carbono

O carbono pode ser considerado o principal elemento da Terra, pois compõe de 40 a 50% da matéria orgânica viva; influencia os ciclos do nitrogênio e do oxigênio, que são elementos importantes; e seu ciclo biogeoquímico vem sofrendo interferências humanas em escala global. Encontra-se presente na natureza na forma elementar, como carbono amorfo, grafite e diamante. Na forma não-elementar, pode-se encontrar átomos de carbono com estado de oxidação variando de +4 a -4, como o dióxido de carbono e carbonatos (Martinelli *et al.*, 2009).

O carbono existe como três isótopos, ^{12}C , ^{13}C e ^{14}C , que em sua estrutura atômica diferem no número de nêutrons, que aumentam de 6 a 8 respectivamente. Os isótopos ^{12}C e ^{13}C são isótopos estáveis; enquanto que o ^{14}C é radioativo, possuindo um tempo de meia-vida de 5.730 anos (Baskaran, 2011).

O isótopo ^{14}C é muito utilizado para fins de datação arqueológicos e em estudos de biocombustíveis, porém não é muito utilizado em estudos ambientais. Já os isótopos estáveis, ^{12}C e ^{13}C são extensamente usados em estudos ambientais (Baskaran, 2011).

1.3. Análise Isotópica de Isótopos Estáveis

A análise de isótopos estáveis possui alta importância em diversas áreas da ciência, representando importante papel na química, medicina, em estudos marinhos, hidrológicos, geoquímicos, e outros. Foi realizada uma busca em duas bases de dados: Science Direct e Web of Science, e foram encontrados 23.571 artigos, com a estratégia de busca no período de 2000 a 2010, utilizando as palavras-chave *stable isotopes* e *isotopic analysis*. Observa-se um crescente uso de isótopos estáveis nos mais diferentes campos da ciência e este fato pode estar refletido no crescente aumento de publicações como apresentado na figura 1 a seguir, que relaciona a evolução do número de artigos publicados no período citado.



Figura 1: Evolução de artigos publicados na última década (Fonte: Banco de dados Science Direct e Web of Science).

A análise isotópica pode ser realizada em amostras sólidas, líquidas ou gasosas. Para que as leituras isotópicas sejam realizadas, é necessário que tanto a amostra como o padrão de referência sejam transformados em uma forma gasosa. A forma gasosa mais utilizada para a análise do carbono é o CO_2 (Martinelli *et al.*, 2009; Meier-Augenstein, 1999).

As concentrações naturais dos isótopos e suas variações podem ser determinadas através da espectrometria de massa de razões isotópicas (EMRS), na qual a amostra é analisada contra um padrão de referência. Os resultados

obtidos podem ser expressos em átomos % (amostras enriquecidas) ou em termos de enriquecimento isotópico relativo, expresso em delta per mil (amostras com abundâncias isotópicas naturais) (Meier-Augenstein, 1999; Rossmann, 2001). Nos equipamentos modernos, estes resultados podem ser obtidos simultaneamente.

1.4. Termos e Definições

A composição isotópica, R , de um determinado elemento é expressa pela relação entre o isótopo raro e o mais abundante, isto é, pelo isótopo mais pesado sobre o isótopo mais leve. Qualquer coisa que altere a razão R determina uma mudança na quantidade de isótopos pesados e leves presentes em um determinado elemento (Martinelli *et al.*, 2009).

O fracionamento isotópico é indicado por um fator de fracionamento (α), que representa a razão entre as proporções isotópicas das diferentes fases de um sistema em equilíbrio. O fator de fracionamento (α) é definido como:

$$\alpha = \frac{R_A}{R_B} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde R_A é a razão entre o isótopo pesado e leve em uma molécula ou fase A e R_B representa o mesmo na fase ou molécula B. Em muitos casos, o fator de enriquecimento de um sistema é dependente da temperatura, o que significa que o fracionamento isotópico na natureza é influenciado pela temperatura do ambiente.

Os valores de α são geralmente próximos à unidade, com isso, por conveniência, definiu-se um outro fator, o fator de enriquecimento isotópico (ϵ) ou a discriminação isotópica (Δ), que é representado por:

$$\epsilon = (\alpha - 1) \quad (\text{Eq. 2})$$

A notação δ denota a composição isotópica de um elemento em uma dada amostra obtida através da comparação da razão isotópica da amostra com a razão isotópica de um material de referência certificado (MRC) arbitrário (Martinelli *et al.*, 2009; Sleiman *et al.*, 2008).

$$\delta = \frac{R_{amostra}}{R_{MRC}} - 1 \quad (\text{Eq. 3})$$

Os MRC's utilizados são variáveis para cada elemento. Os MRC's Vienna Peedee Belemnitella (V-PDM), Nitrogênio atmosférico (N₂ atm), Vienna standard mean ocean water (V-SMOW), Vienna Cañon Diable Mevalorite Troilite (V-CDMT) são utilizados para os elementos carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre, respectivamente. O MRC V-SMOW também pode ser utilizado para o elemento deutério. A tabela 2 apresenta as razões isotópicas absolutas dos padrões internacionais.

Tabela 2: Razão Isotópica absoluta dos MRC's internacionais.

Razões Isotópicas absolutas	Material de Referência Certificado Internacional
² H/ ¹ H = 0,00015576	
¹⁸ O/ ¹⁶ O = 0,00200520	V-SMOW
¹⁷ O/ ¹⁶ O = 0,00037300	
¹³ C/ ¹² C = 0,01123720	
¹⁸ O/ ¹⁶ O = 0,00206710	V-PDM
¹⁷ O/ ¹⁶ O = 0,00037900	
¹⁵ N/ ¹⁴ N = 0,00367650	N ₂ atm
³⁴ S/ ³² S = 0,04500450	
³³ S/ ³² S = 0,00810000	V-CDMT

Fonte: Nogueira, 2008.

O MRC V-PDM, trata-se de um fóssil carbonatado sólido, da era Cretácea, denominado *Bellemitella americana*, da formação geológica Peedee do Estado norte-americano da Carolina do Sul o qual foi empregado inicialmente como padrão por Craig em 1957 (Oliveira *et al.*, 2002; Rossmann, 2001; 1999; Sleiman *et al.*, 2008).

No estudo da variabilidade isotópica natural dos elementos, a terminologia “delta per mil” (δ ‰) é utilizada. A eq. 4 é a equação genérica para o cálculo do “delta per mil” de um dado elemento.

$$\delta X (\text{‰})_{(amostra, MRC)} = \left(\frac{R_{amostra} - R_{MRC}}{R_{MRC}} \right) * 1000 \quad (\text{Eq. 4})$$

onde $\delta X(\text{‰})_{(\text{amostra, padrão})}$ é o enriquecimento isotópico da amostra relativo ao MRC, para um elemento químico genérico, R_{amostra} é a razão isotópica da amostra e R_{MRC} a razão isotópica do MRC. Devido ao fato dos valores de R e δ serem numericamente pequenos, convencionou-se multiplicar o valor de δ por 1.000 (Martinelli *et al.*, 2009). Exemplificando a eq. (4), vemos a equação para o cálculo da composição isotópica do carbono na eq. 5 (Oliveira *et al.*, 2002).

$$\delta C(\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{amostra}} - R_{\text{MRC}}}{R_{\text{MRC}}} \right) * 1000 \quad (\text{Eq. 5})$$

onde R_{amostra} é a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e R_{MRC} a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do MRC. A eq. 6 explicita a relação entre amostra e MRC:

$$\delta C(\text{‰}) = \left(\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{amostra}} - \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{MRC}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{MRC}}} \right) * 1000 \quad (\text{Eq. 6})$$

Valores isotópicos com sinal negativo significam que a amostra apresenta razão isotópica menor que o padrão e que possui menos espécies isotópicas pesadas comparadas a este (Pereira e Benedito, 2007; Sleiman *et al.*, 2008), conforme mostram as figuras 2 e 3.

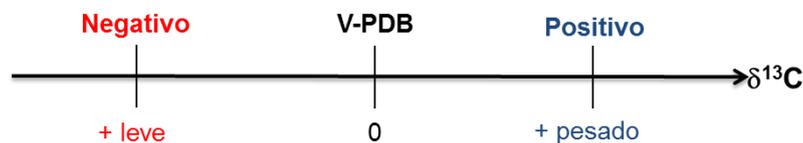


Figura 2: Relação entre resultados positivos e negativos de amostras com o isótopo de carbono mais pesado (^{13}C) (adaptado de Nogueira, 2008).

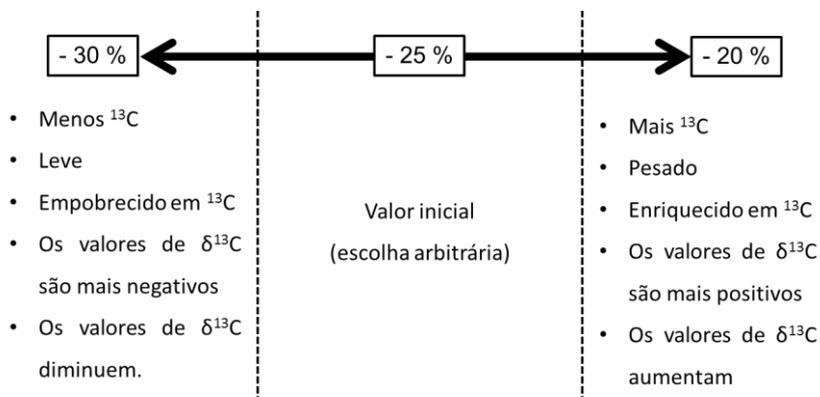


Figura 3: representação esquemática das mudanças nos valores de $\delta(^{13}\text{C})$ (adaptado de Baskaran, 2011).

2 **Objetivos**

2.1. **Objetivo Geral**

Desenvolver uma metodologia de espectrometria a laser que determine a razão isotópica de carbono em amostras líquidas e sólidas utilizando a técnica de cavidade ressonante do tipo *ring-down* (*Cavity Ring-Down Spectroscopy* – CRDS).

2.2. **Objetivos Específicos**

- Desenvolvimento e implantação do método de análise isotópica empregando-se um analisador a laser
- Comparação dos resultados obtidos com aqueles obtidos por EMRI a fim de validar os resultados

3 Considerações Gerais

A análise isotópica de isótopos estáveis é utilizada em diversas aplicações, tais como: análise de alimentos e bebidas, análise de fármacos, estudos arqueológicos, determinação de *doping*, identificação isotópica da origem dos solos, estudos hidrológicos, traçar padrões e verificar mecanismos fisiológicos em organismos; traçar fluxos energéticos em cadeias alimentares, no entendimento de paleo-dietas, entre outros (Benson *et al.*, 2006; Martinelli *et al.*, 2009; Pereira e Benedito, 2007; Peterson e Fry, 1987). Neste tópico serão citados diversos trabalhos que utilizaram a análise isotópica de carbono e de outros elementos para os mais diversos fins.

Uma das aplicações mais utilizadas dos isótopos estáveis de carbono tem sido na detecção de misturas de compostos produzidos a partir de plantas C3 e C4, em função da grande diferença entre a composição isotópica destes dois tipos de plantas. O $\delta(^{13}\text{C})$ das plantas C3 varia de -32 a -22‰, já o das plantas C4 varia de -17 a -9‰ (Farquhar *et al.*, 1989; Farquhar *et al.*, 1982; Martinelli *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2002). Nesta aplicação podem-se incluir as análises de adulterações em bebidas e alimentos; determinação da origem botânica; dentre outro.

Park e Epstein (1960), Farquhar *et al.* (1982) e Farquhar (1983) desenvolveram uma teoria para explicar a composição isotópica das plantas C3 e C4, mostrando como a difusão do gás CO₂ durante a fotossíntese pode afetar significativamente a discriminação isotópica do carbono. Em 1989, Farquhar *et al.* fizeram um levantamento sobre os trabalhos existentes envolvendo a discriminação isotópica do carbono durante a fotossíntese; descreveram as teorias envolvidas e como os efeitos ambientais influenciam.

Martinelli *et al.* (1991) estudou a variação isotópica do carbono nas plantas C3 e C4 ao longo do Rio Amazonas. Ballentine *et al.* (1998) utilizaram a análise isotópica de compostos específicos (AICE) para caracterizar isotopicamente as espécies orgânicas traço produzidas durante a queima de biomassas, tanto de

plantas C3 quanto de plantas C4, a fim de permitir uma melhor compreensão da fonte e do destino da matéria orgânica proveniente da combustão. Kato *et al.* (1999) mediu a composição isotópica do monóxido de carbono através da queima de plantas, com o auxílio de um EMRI, para fornecer informações sobre as composições isotópicas do CO proveniente da queima de biomassas.

No tocante aos estudos relacionados às bebidas, podemos citar diversos trabalhos. Pissinatto *et al.* (1999) utilizaram a composição isotópica de carbono de *brandies* brasileiros a fim de determinar a contribuição do açúcar oriundo de plantas C3 e C4. Como a diferença isotópica é bem acentuada entre esses dois tipos de plantas, foi possível obter a origem botânica do etanol dos *brandies* estudados.

Silva *et al.* (1999) elaboraram uma revisão sobre adulterações de sucos de frutas pela adição de açúcares. Neste trabalho eles descrevem como os isótopos de carbono, hidrogênio e oxigênio podem auxiliar na detecção de adulterações de sucos por açúcares e as técnicas empregadas.

Pupin *et al.* (1998), Simpkins *et al.* (2000) e Queiroz *et al.* (2009; 2007) analisaram diversas amostras de bebidas comerciais a base de laranja a fim de estimar a proporção de carbono C3 e C4, através da determinação da razão isotópica de carbono. Já Oliveira *et al.* (2002) utilizaram a análise isotópica, com o auxílio de um EMRI, para obter a composição isotópica do carbono a fim de determinar a origem botânica de amostras de café, vinho, cerveja e vodka de diferentes marcas e procedências comercializadas no Brasil.

Figueira *et al.* (2010a; 2010b; 2011a; 2011b) desenvolveram um método de análise isotópica para quantificar o carbono do ciclo fotossintético C3 em sucos e polpas de uva, laranja e caju a fim de identificar as bebidas que não se encontram em conformidade com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Um estudo similar foi realizado por Nogueira *et al.* (2011) para detectar adulteração em néctares comerciais de pêssego. Este estudo foi baseado em Figueira *et al.* (2010b).

Brooks *et al.* (2002) e Sleiman *et al.* (2008; 2010) utilizaram a análise isotópica para analisar cervejas. Em 2002, Brooks *et al.* utilizaram um EMRI para detectar a assinatura isotópica de carbono de plantas C₄ em amostras de

cervejas de diferentes origens, estilos e preços. Em 2008, Sleiman *et al.* desenvolveram uma metodologia capaz de quantificar a proporção de malte utilizada no processo de fabricação de cervejas do tipo Pilsen, através dos isótopos estáveis de carbono (^{13}C) e nitrogênio (^{15}N). Para tal estudo, foi utilizado um analisador elementar (AE) acoplado a um EMRI (AE-EMRI). Já em 2010, Sleiman *et al.* determinaram o percentual de malte e de adjuntos em cervejas comerciais brasileiras e verificaram possíveis adulterações.

Di Paola-Naranjo *et al.* (2011) utilizou diversos parâmetros, dentre eles a análise isotópica de carbono, para determinar a identidade (*fingerprint*) de três vinhos Argentinos.

Rossmann (2001) e Ghidini *et al.* (2006) fizeram um levantamento a respeito da utilização da análise isotópica para análise e autenticação de alimentos. Há na literatura diversos trabalhos relacionados com a análise de mel; óleos vegetais; dentre outros.

No que se refere aos estudos relacionados à análise de mel, podemos citar Rossi *et al.* (1999) e Arauco *et al.* (2008a; 2008b). Rossi *et al.* (1999), com o auxílio de um espectrômetro de massas, determinou a razão isotópica de carbono em diferentes amostras de mel, a fim de determinar sua assinatura isotópica e possíveis adulterações com açúcares comerciais. Já Arauco *et al.* (2008a; 2008b) analisaram a variabilidade isotópica do carbono em proteínas de méis brasileiros. A metodologia utilizada foi a metodologia oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e as análises foram realizadas utilizando um analisador elementar acoplado a um espectrômetro de massas. Eles comprovaram que esta metodologia é útil na identificação da origem botânica do mel, na diferenciação de méis de alguns estados do Brasil e na identificação de adulteração.

A companhia Picarro (Application Note #022; Application Note #023) também analisou amostras de mel utilizando a metodologia AOAC, porém o equipamento utilizado para realizar as amostras foi um espectrômetro de cavidade ressonante do tipo *ring-down* acoplado a um módulo de combustão (ECRRD-MC) para converter o carbono das amostras de mel em CO_2 . Padovan *et al.* (2003), com o auxílio de um cromatógrafo gasoso (CG) acoplado a um EMRI (CG-EMRI), analisaram várias amostras de méis de diferentes países, a

fim de detectar adulteração por meio de xarope de milho com alta concentração de frutose (XMACF). Eles encontraram adulteração em seis amostras de méis brasileiros. Em 2010, Souza-Kruliski *et al.* analisaram méis comercializados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, para a detecção de fraudes, utilizando a mesma metodologia utilizada por Arauco *et al.* (2008a; 2008b).

Com relação aos estudos relacionados com óleos vegetais, Angerosa *et al.* (1999; 1997) utilizaram a análise isotópica para analisar amostras de óleo de oliva. Em um primeiro estudo (Angerosa *et al.*, 1997) utilizou um CG de alta eficiência (CGAE) e um espectrômetro de massas de razões isotópicas (IRMS) para determinar adulterações em óleos de oliva através da comparação da razão de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. A Picarro (Application Note #018) também analisou óleos vegetais para determinar se havia adulteração, porém o equipamento utilizado foi um analisador de carbono orgânico total (ACOT) acoplado a um ECRRD (ACOT-ECRRD).

Em 1999, Angerosa *et al.* utilizaram a análise isotópica de carbono para caracterizar a origem geográfica de óleos de oliva, com o auxílio de um espectrômetro de massas com interface *on-line* a um analisador elementar para realizar a combustão das amostras. Kelly *et al.* (2002) elaboraram um levantamento das técnicas utilizadas para a análise isotópica em óleos vegetais. Neste estudo foi citada a técnica de espectrometria de massas de razões de isótopos estáveis (EMRIE); e as técnicas emergentes: composto específico – espectrometria de massas de isótopos (CE-EMI) e posição específica – espectrometria de massas de isótopos (PE-EMI).

Rossi *et al.* (2007) determinaram a assinatura isotópica de milhos de origem natural e transgênica, utilizando um analisador elementar acoplado a um espectrômetro de massas (AE-EM).

Nakashita *et al.* (2008) utilizaram a análise isotópica dos isótopos estáveis de carbono, nitrogênio e oxigênio como ferramenta para verificar geograficamente a origem da carne bovina de três países: Estados Unidos, Austrália e Japão.

Suzuki *et al.* (2008) determinaram a assinatura isotópica de carbono em amostras de arroz para criar um método capaz de determinar sua origem

geográfica. Além da assinatura isotópica do carbono, foram obtidas as assinaturas isotópicas de outros elementos (nitrogênio e oxigênio). As medidas das razões isotópicas foram realizadas através de um AE-EMRI.

Martinelli *et al.* (2009) cita a utilização da análise dos isótopos estáveis de nitrogênio e carbono no estudo dos animais e sua dieta.

Peterson *et al.* (1987) descrevem diversas aplicações da análise isotópica, utilizando os isótopos estáveis de carbono, nitrogênio, enxofre, hidrogênio e oxigênio em estudos relacionados com o ecossistema.

Novák *et al.* (2003) descrevem as similaridades entre o perfil dos isótopos estáveis de carbono, nitrogênio e enxofre em ecossistemas florestais europeus.

Silveira e Júnior (2002) fizeram uma listagem histórica dos principais estudos hidrológicos no Brasil utilizando isótopos ambientais de hidrogênio, oxigênio, carbono.

Kerstel *et al.* (1999) demonstraram com sucesso a primeira aplicação da utilização da espectroscopia de infravermelho a laser para determinar a razão da abundância isotópica de $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, simultaneamente em água.

Hedges *et al.* (2004) fizeram um breve relato da utilização da análise da composição de isótopos estáveis em ossos, como uma ferramenta em investigações paleoclimáticas. Os isótopos que podem ser estudados são os de carbono, oxigênio e nitrogênio, sendo que o último somente quando há proteína (colágeno) remanescente suficiente.

Benson *et al.* (2006) desenvolveram uma revisão a respeito da utilização da espectrometria de massas de razões isotópicas em estudos forenses. Neste trabalho são citadas diversas aplicações forenses e os acoplamentos utilizados junto ao EMRI.

Werner e Brand (2001) fizeram um levantamento a respeito das estratégias e técnicas utilizadas na análise de isótopos estáveis. Dentre as diversas análises citadas no trabalho, podemos ressaltar a análise do CO_2 presente no ar, pois ele

serve para restringir as fontes e sumidouros deste importante gás do efeito estufa na atmosfera.

Jasper *et al.* (2004), utilizou um AE-EMRI, para determinar a assinatura isotópica, de carbono e nitrogênio, em materiais farmacêuticos.

Brandes (2009) criou uma metodologia para medir de forma rápida e precisa a composição isotópica de carbono, $\delta(^{13}\text{C})$ do carbono inorgânico dissolvido (CID) em sistemas naturais. Para esse estudo, ele utilizou um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas de razões isotópicas.

Bhat *et al.* (2010) descrevem diversas aplicações da análise isotópica, usando tanto isótopos estáveis quanto radioativos, em estudos dos solos. Algumas das aplicações citadas foram: gestão da fertilidade do solo; estudos da erosão e de formação dos solos e avaliação da poluição dos solos.

Suzuki *et al.* (2010) determinaram a composição isotópica de plásticos a fim de diferenciá-los de plásticos oriundos do petróleo e de plásticos derivados de plantas. Eles verificaram que os plásticos oriundos de plantas do tipo C4 possuem valores mais altos do que os derivados de petróleo e de plantas do tipo C3, porém não há diferenças significativas entre os valores encontrados para os derivados de petróleo e de plantas C3. As análises foram realizadas com o auxílio de um AE-EMRI.

Giebel *et al.* (2011) fizeram um estudo a respeito do etanol combustível, utilizando um CG-EMRI. Eles utilizaram as medidas da razão isotópica de carbono do etanol emitido de veículos e um pequeno grupo de plantas tropicais para fazer comparações nos resultados de $\delta(^{13}\text{C})$ obtidos.

Louie *et al.* (1993); Fixari *et al.* (1994); Rogers e Savard (1999); Mazeas e Budzinski (2001); Sun *et al.* (2003); Hough *et al.* (2006); Li *et al.* (2009) e Oil Analytical (Application Note #36680211) determinaram a assinatura isotópica de carbono do petróleo e de produtos de origem petrogênica.

Crosson *et al.* (2002) construíram um espectrômetro a laser de cavidade ressonante do tipo *ring-down* capaz de medir a razão isotópica de carbono no

CO₂ presente na respiração humana. Eles obtiveram valores de $\delta(^{13}\text{C})$ para amostras de pessoas que possuíam ou não a bactéria *Helicobacter pylori*, que é a principal causadora de úlceras estomacais em humanos. Este estudo demonstrou que este instrumento obtém valores de $\delta(^{13}\text{C})$, nas amostras estudadas, com precisão suficiente para servir como ferramenta em diagnósticos médicos.

Atkinson (2003) e Brown (2003) utilizaram a técnica de espectroscopia de cavidade ressonante do tipo *ring-down* para estudar diversos compostos presentes na atmosfera. Alguns dos compostos estudados foram óxidos de nitrogênio; metano; hidrocarbonetos; dióxido e monóxido de carbono.

Whal *et al.* (2006) testaram um instrumento ótico de absorção baseado na técnica espectroscópica de cavidade ressonante do tipo *ring-down* para fazer medições altamente precisas das razões isotópicas do carbono no dióxido de carbono (CO₂). Este equipamento foi primeiramente testado nas instalações da Picarro, e depois na Universidade de Utah. O experimento demonstrou que o equipamento precisa de mais ajustes para ser capaz de fazer medições isotópicas de carbono na atmosfera.

Tomita *et al.* (2006) desenvolveram um sistema de análise isotópica portátil baseado na espectrometria a laser de cavidade ressonante do tipo *ring-down* de onda contínua de varredura rápida.

Crunaire *et al.* (2006) demonstraram pela primeira vez o acoplamento entre um ECRRD com uma câmara ambiental para fazer a investigação dos mecanismos de reação fotoinduzidas. A primeira aplicação foi dedicada à investigação da razão de ramificação do radical OH nas reações com •CH₃C(O)OH e CH₃C(O)OD sob condições troposféricas.

Zare *et al.* (2009) utilizou um CG com uma interface de combustão acoplado a um ECRRD de fluxo contínuo (CG-C-ECRRDFC) para fazer a análise isotópica de misturas de compostos orgânicos. Este experimento mostrou que modificações devem ser feitas para melhorar o sistema, mas que ele é capaz de fazer medições da razão ¹³C/¹²C de qualquer mistura de compostos orgânicos que podem ser separados através da cromatografia gasosa.

Chen *et al.* (2010) fizeram medições contínuas de alta precisão de gases do efeito estufa (CO_2 e CH_4) durante a campanha BARCA (Balanço Atmosférico Regional de Carbono na Amazônia) fase B realizada no Brasil em maio de 2009. Tais medições foram realizadas utilizando um analisador baseado na técnica espectrométrica de cavidade ressonante do tipo *ring-down*.

Berryman *et al.* (2011) demonstraram a aplicabilidade de um ECRRD para medir as razões isotópicas de carbono no CO_2 . Eles fizeram uma comparação deste método com um CG-EMRI.

A figura 4 mostra as faixas de valores esperados de alguns objetos de estudos anteriormente citados.

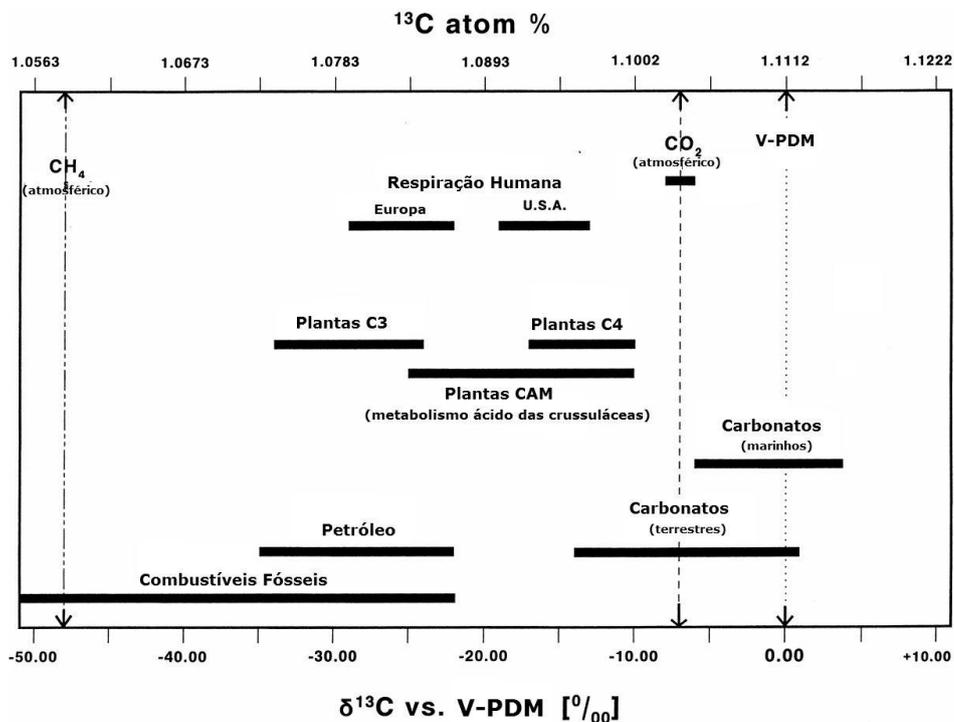


Figura 4: Alguns exemplos típicos de valores de $\delta(^{13}\text{C})$ agrupados segundo sua origem ao longo da escala de abundância natural de C. (adaptado de Meier-Augestein, 1999).

4 Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram amostras de biomassas, bio-óleo, biocombustível, açúcar, metanol e gasolina. Cada uma apresenta diferentes características, que serão exemplificadas a seguir.

4.1 Biomassas

Biomassa é um material constituído principalmente de substâncias de origem orgânica, ou seja, de animais e vegetais. Através de sua queima pode-se obter energia (Dias *et al.*, 2009). A energia pode ser obtida através da combustão da lenha, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos florestais, resíduos agrícolas, casca de arroz, excrementos de animais, entre outras matérias orgânicas. Entre as principais vantagens da utilização da biomassa estão: baixo custo de operação; facilidade de armazenamento e transporte; proporciona o reaproveitamento dos resíduos; alta eficiência energética; é uma fonte de energia renovável; emite menos gases poluentes (Arakaki, 2010).

Sua utilização é de fundamental importância no desenvolvimento de novas alternativas energéticas. Vários biocombustíveis são produzidos a partir da matéria-prima das biomassas, como, por exemplo, o bioetanol, o bio-óleo, biodiesel, biogás, entre outros.

A metodologia da razão isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) é extremamente útil na caracterização de carbono de diferentes espécies botânicas, pois se baseia no fracionamento isotópico do carbono associado à fotossíntese. A assimilação do CO_2 atmosférico pode ser realizada através de três formas distintas, sendo que apenas duas destas são as mais frequentes, plantas C3 e C4 (Oliveira *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2009; Queiroz *et al.*, 2007).

4.1.1. Plantas dos Ciclos Fotossintéticos C3 e C4

O'Leary (1988) estudou o fracionamento dos isótopos de carbono associado à fotossíntese, provando que esse fracionamento associado aos diversos processos que ocorrem durante a fotossíntese é bem distinto. Há três grupos de plantas que assimilam o CO₂ atmosférico de forma diferente durante seus ciclos fotossintéticos, sendo esses: C3, C4 e CAM (metabolismo ácido das crassuláceas). A composição isotópica destes diferentes tipos fotossintéticos está relacionado com as propriedades bioquímicas das enzimas de fixação do CO₂ atmosférico (RuBP-carboxilase e PEP-carboxilase); com as limitações da difusão do CO₂ para o interior das folhas; com a relação entre a pressão interna de CO₂ na câmara estomatal e com a pressão externa da atmosfera (Farquhar *et al.*, 1989; Oliveira *et al.*, 2002). Outros fatores biológicos e ambientais que influenciam no valor de $\delta(^{13}\text{C})$ (‰) de plantas C3 e C4 podem ser observadas através da tabela 3.

As duas principais vias bioquímicas para a fixação de carbono são as de plantas com o ciclo fotossintético de Calvin-Benson (denominado C3) e de Hatch-Slack (denominado C4). Essa nomenclatura refere-se ao fato do primeiro composto orgânico sintetizado conter 3 e 4 átomos de carbono, respectivamente (Farquhar *et al.*, 1989).

Tabela 3: Fatores biológicos e ambientais que influenciam no valor de $\delta(^{13}\text{C})$ (‰) de plantas C3 e C4.

Ambientais	Biológicos
Concentração de CO ₂ na atmosfera	Capacidade fotossintética
Irradiância (fotoperíodo)	Estágio de desenvolvimento
Déficit na pressão de vapor	Variação genética
Disponibilidade de umidade no solo	Competição
Salinidade	Forma de crescimento
Fertilidade do solo	Fixação biológica de N ₂
Poluição do ar	Estágio vegetativo
Altitude	
Posição na paisagem	

Fonte: Trivelin, 2009.

4.1.1.1. Fracionamento pelas plantas C3

Plantas do ciclo fotossintético C3 reduzem o CO_2 a fosfoglicerato (um composto de três carbonos) (Farquhar *et al.*, 1982; Oliveira *et al.*, 2002). A maioria das espécies de plantas da superfície terrestre possuem este tipo de ciclo fotossintético. Uma grande parte dessas espécies é dominante na maioria dos ecossistemas das regiões boreais dos trópicos (Farquhar *et al.*, 1989).

Na rota bioquímica da síntese de carboidratos em plantas C3, o CO_2 entra nas folhas pelos estômatos por difusão, e através deste mesmo processo passa para as células do mesófilo. Nestas células, ocorre o processo de síntese orgânica, conhecido como ciclo fotossintético de Calvin-Benson, no qual a enzima ribulose carboxilase oxigenase (RuBP-carboxilase) catalisa a reação de redução do CO_2 a duas moléculas de ácido 3-fosfoglicerato (3-PGA), que serão convertidas em carboidrato. O carboidrato formado será distribuído (ou translocado) para as demais partes do vegetal através do sistema de vasos (Farquhar *et al.*, 1982; Oliveira *et al.*, 2002; Silva, B. M. *et al.*, 1999). A Figura 5 ilustra a rota bioquímica da síntese de carboidratos em plantas C3.

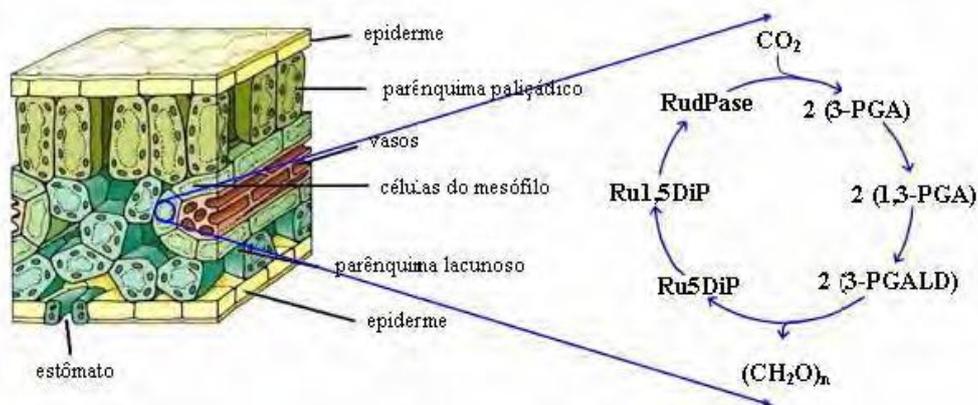


Figura 5: Rota bioquímica da síntese de carboidratos em plantas C3, Ciclo de Calvin-Benson (Fonte: Nogueira, 2008).

O $\delta(^{13}\text{C})$ (‰) destas plantas pode variar de -32 a -22 ‰, com média de -27 ‰ (Farquhar *et al.*, 1982; Martinelli *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2002). O modelo matemático para o cálculo deste fracionamento foi desenvolvido por Farquhar *et al.* (1982). Alguns exemplos de plantas C3 são o pêssego, a laranja, a maçã, a uva, o arroz e a cevada (Oliveira *et al.*, 2002).

4.1.1.2. Fracionamento pelas plantas C4

As plantas C4 compreendem cerca de 5% de todas as espécies terrestres. Metade são gramíneas de origem tropical e subtropical. Cerca de 17% da superfície terrestre é coberta por estas plantas, constituindo a vegetação de savanas, pântanos, mangues e pastagens naturais. 20 a 30% da fotossíntese global é devido às plantas C4. A cana-de-açúcar, o milho e o sorgo são alguns exemplos de plantas C4 (Farquhar, 1983; Queiroz *et al.*, 2009; Queiroz *et al.*, 2007).

Estas apresentam algumas diferenças, quando comparadas com as plantas C3. A primeira delas é referente à anatomia foliar destas plantas; as plantas C4 possuem dois tipos de cloroplastos: o do mesófilo e o da bainha. Funcionalmente, pode-se notar outra diferença fundamental: a produção de carboidratos não ocorre nas células do mesófilo, mas sim nas células da bainha (Farquhar, 1983; Farquhar *et al.*, 1989; Queiroz *et al.*, 2009).

Na rota bioquímica da síntese de carboidratos em plantas C4, o CO₂ entra pelos estômatos por difusão, passa para as células do mesófilo, onde é fixado na forma de HCO₃⁻. Esta rota sintética é conhecida como ciclo de Hatch-Slack. Este composto reage com fosfoenolpiruvato (PEP), cuja reação é catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcarboxilase), formando oxalacetato, que por sua vez é reduzido a ácido aspártico ou ácido málico (ambos com 4 átomos de carbono). Estes compostos são transportados para as células da bainha, onde são descarboxilados para formar o CO₂ e piruvato. O CO₂ concentrado por esse processo entra para o ciclo bioquímico de síntese orgânica da mesma forma que no ciclo das plantas C3, resultando na produção de carboidratos (Farquhar, 1983; Farquhar *et al.*, 1989; Oliveira *et al.*, 2002; Silva, B. M. *et al.*, 1999). A rota bioquímica da síntese de carboidratos em plantas C4 é apresentada através da figura 6.

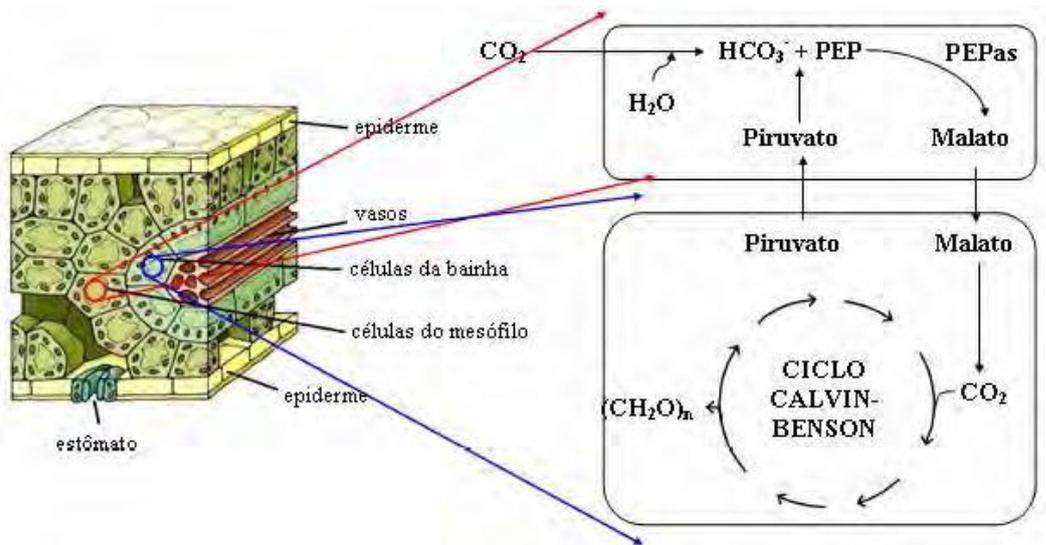


Figura 6: Rota bioquímica da síntese de carboidratos em plantas C₄, Ciclo de Hatch-Slack (Fonte: Nogueira, 2008).

As plantas C₄ discriminam menos o ¹³C e possuem maiores valores de $\delta(^{13}\text{C})$ (‰) que as plantas C₃. O $\delta(^{13}\text{C})$ (‰) destas plantas pode variar de -17 a -9 ‰, com média de -13‰ (Farquhar *et al.*, 1989; Martinelli *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2002; Padovan *et al.*, 2003; Pupin *et al.*, 1998; Rossi, N. F. *et al.*, 1999; Silva, B. M. *et al.*, 1999; Sleiman *et al.*, 2008), conforme mostra a Figura 7. O modelo matemático para o cálculo deste fracionamento foi desenvolvido por Farquhar (1983).

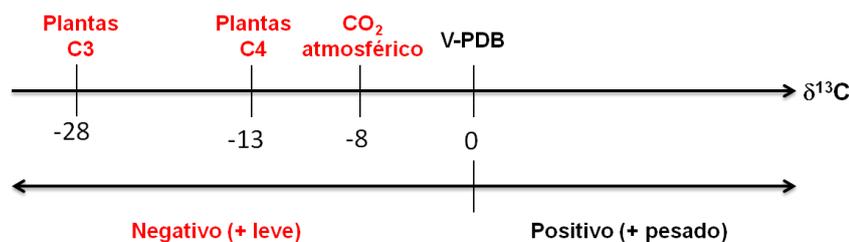


Figura 7: Enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) do CO₂ atmosférico, das plantas C₃ e das plantas C₄ (adaptado de Nogueira, 2008).

Dessa forma, as espécies C₃ e C₄ apresentam valores de $\delta(^{13}\text{C})$ distintos entre si, que não se sobrepõem, sendo possível, portanto, a utilização desses valores na determinação da fonte de carbono (Farquhar *et al.*, 1989; Oliveira *et al.*, 2002). Tal diferença também é observada nos seus respectivos produtos industrializados, como suco, açúcar, álcool, etc. podendo verificar, com precisão, qual a origem botânica do carbono em determinado produto (Rossmann, 2001).

4.2. Biocombustíveis

Os biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir de qualquer biomassa renovável. Eles permitem a ciclagem da matéria orgânica na natureza. Podem ser fabricados a partir de vegetais, tais como: milho, soja, cana-de-açúcar, mamona, canola, babaçu, cânhamo, entre outros. O lixo orgânico também pode ser usado para a fabricação de biocombustível. Os principais biocombustíveis são: etanol (produzido a partir da cana-de-açúcar, milho, beterraba, trigo, mandioca, entre outros), biogás, bioéter, biodiesel, entre outros. Eles podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia (Puerto Rico *et al.*, 2010).

A vantagem do uso dos biocombustíveis é a redução significativa da emissão de gases poluentes. Também é vantajoso, pois é uma fonte de energia renovável ao contrário dos combustíveis fósseis (Petrobrás; Voigt, 2009).

Devido ao grande investimento no estudo dos biocombustíveis, o Brasil passou a ser um pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, alcançando uma posição almejada por muitos países que buscam fontes renováveis de energia como alternativas estratégicas ao petróleo (Goldemberg, 2006; Silva, 2010). A figura 8 mostra o crescimento médio anual, no período de 2005 a 2010, dos combustíveis de origem não petrogênica.

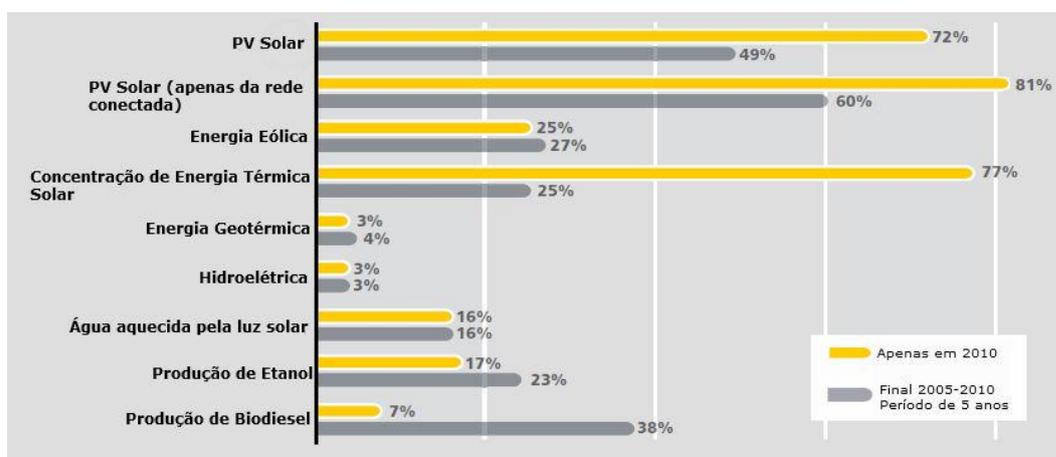


Figura 8: Crescimento médio anual da capacidade de energia renovável e produção de biocombustíveis (adaptado de REN21, 2011).

Cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil já são renováveis. No resto do mundo, 80,6% da energia vêm de fontes energéticas não-renováveis (Freitas, 2008; Goldemberg *et al.*, 2008; Puerto Rico *et al.*, 2010; REN21, 2011). A figura 9 mostra as principais fontes energéticas utilizadas no mundo em 2010.

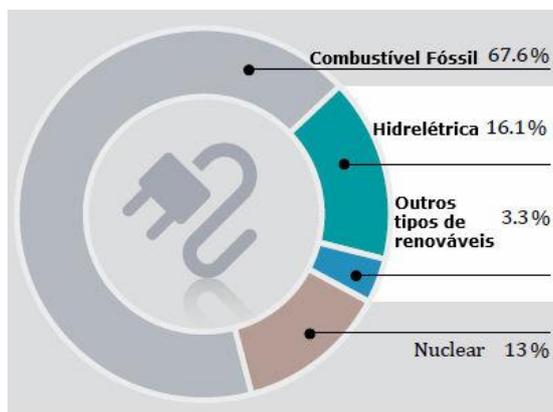


Figura 9: Distribuição do uso das principais fontes energéticas (adaptado de REN21, 2011).

Segundo a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis) os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol obtido a partir da cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, que é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais e adicionado ao diesel de petróleo na proporção de 5%.

A figura 10 apresenta um resumo da evolução dos biocombustíveis no Brasil, mostrando desde a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1974 até abril de 2011, onde a ANP passou a regular e fiscalizar a produção de etanol, considerado neste momento como sendo um biocombustível. A vigência do B2 se refere à adição de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo, já vigência do B5 se refere à adição de 5% deste.

A metodologia da razão isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) para biocombustíveis funciona da mesma forma que para as biomassas, já que eles são derivados desta. Portanto, a assinatura isotópica do biocombustível a ser analisado deve ser próxima da assinatura isotópica de sua biomassa de origem.

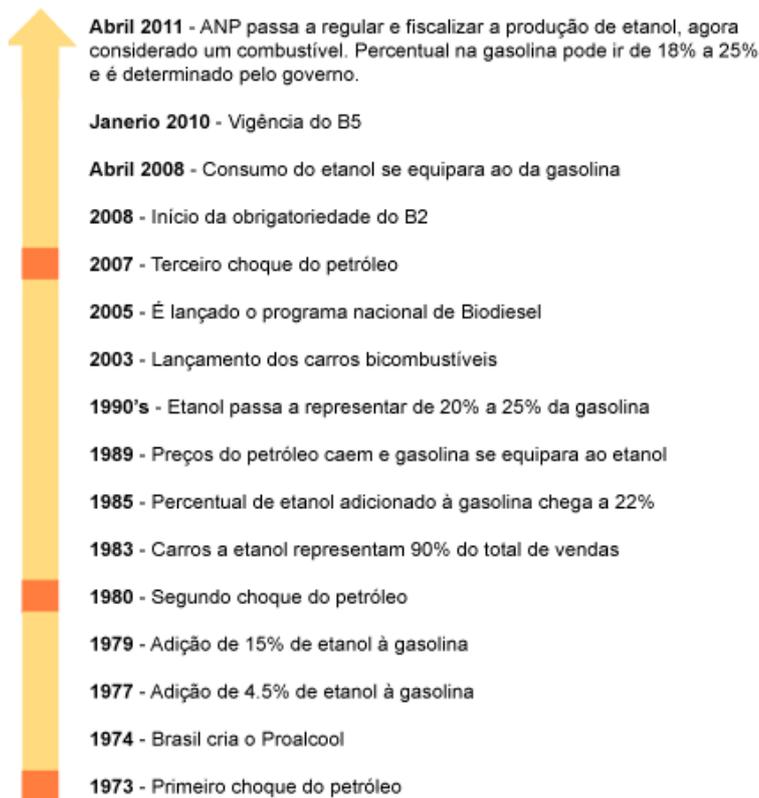


Figura 10: A evolução dos biocombustíveis no Brasil (Fonte: ANP).

4.2.1. Etanol

O etanol é um líquido incolor, volátil, de odor característico, miscível com a maioria dos líquidos de baixo peso molecular. É solúvel em água em todas as proporções devido à similaridade de suas características (Pérez, 2007).

O etanol é um biocombustível, sendo a cana-de-açúcar a matéria-prima que oferece mais vantagens energéticas e econômicas para a sua produção. O Brasil só produz etanol de cana, enquanto que em outros países, como os EUA, o etanol pode ser produzido a partir do milho (Crago *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2009; Silveira, 2009; Smeets *et al.*, 2008).

A cana-de-açúcar é a segunda maior fonte de energia renovável do Brasil, com 12,6% de participação na matriz energética atual. Através dela obtém-se o álcool combustível e a cogeração de eletricidade a partir do bagaço da cana (Silva, A. T. B. D., 2010). Cerca de 85% da cana-de-açúcar produzida no Brasil está na Região Centro-Sul (concentrada em São Paulo, com 60% da produção)

e os 15% restantes na região Norte-Nordeste (Freitas, 2008; Puerto Rico *et al.*, 2010; Smeets *et al.*, 2008).

Existem duas gerações de etanol, onde a primeira geração está relacionada à produção de etanol através da fermentação da sacarose do caldo de cana. A segunda geração diz respeito ao etanol produzido a partir de diversas fontes de biomassa vegetal, dando-se preferência para matérias-primas não destinadas à alimentação humana. As matérias-primas podem ser espécies vegetais de alta biomassa dedicadas à produção do etanol de segunda geração ou resíduos de culturas utilizadas na produção do etanol de primeira geração, como o bagaço da cana e a torta da mamona, utilizados respectivamente para produção de etanol a partir do caldo da cana e de biodiesel do óleo da mamona. No Brasil, dentre as espécies de alta biomassa que apresentam grande potencial está o sorgo (Embrapa Milho e Sorgo, 2012).

O etanol de segunda geração é produzido a partir da biomassa vegetal, que é composta principalmente pela celulose, um polímero formado por cadeias de glicose. Um dos principais problemas da produção do etanol de segunda geração é o pré-tratamento, que tem a função de desestruturar a parede celular, deixando os compostos mais acessíveis aos tratamentos seguintes. O pré-tratamento irá variar conforme o tipo de biomassa utilizado, o que torna o processo bastante complexo e caro (Embrapa Milho e Sorgo, 2012; Toledo, 2012).

A utilização de biocombustíveis de segunda geração, principalmente a partir de resíduos de culturas alimentares ou mesmo culturas dedicadas à produção desse tipo de biocombustível, permitirá que se consiga extrair das espécies utilizadas maior quantidade de energia por hectare cultivado, o que economicamente é bastante interessante. Em termos ambientais, isso também quer dizer que menores áreas de plantio serão necessárias, além do sequestro de CO₂ da atmosfera, uma das maiores vantagens de utilização de espécies vegetais para bioenergia (Embrapa Milho e Sorgo, 2012).

Os automóveis que circulam no país usam dois tipos de etanol combustível: o hidratado, consumido em motores desenvolvidos para este fim, e o anidro, que é misturado à gasolina, sem prejuízo para os motores, em proporções variáveis (Pérez, 2007). Esta divisão é determinada pela formação

da mistura azeotrópica (Pérez, 2007). O etanol hidratado possui cerca de 93% de etanol puro e 7% de água. Sua utilização no Brasil iniciou-se em 1979, com o lançamento dos carros a álcool, na segunda fase do Proálcool. Através da Portaria nº 143 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, criada em julho de 2007, toda gasolina vendida no Brasil contém 25% de etanol combustível anidro (ANP, 2011; Puerto Rico *et al.*, 2010).

A utilização do etanol como combustível é considerada um dos principais mecanismos de combate ao aquecimento global, pois reduz as emissões de gás carbônico (CO₂). Parte do CO₂ emitido pelos veículos movidos a etanol é reabsorvido pelas plantações de cana-de-açúcar, fazendo com que as emissões do CO₂ sejam parcialmente compensadas (ANP, 2011; Pérez, 2007).

Em 2010, os países que se destacaram na produção mundial de etanol foram os Estados Unidos, Brasil, China, Canadá e França. A produção mundial de etanol combustível em 2010 alcançou um valor estimado de 86 bilhões de litros, um aumento de 17% em relação ao que foi produzido em 2009. Os Estados Unidos e o Brasil foram em 2010 os responsáveis por 88% da produção mundial de etanol, sendo que os Estados Unidos sozinho produziu 57% do total produzido no mundo (REN21, 2011). Através da figura 11 pode-se observar o crescimento da produção mundial de etanol no período de 2000 a 2010 (REN21, 2011).

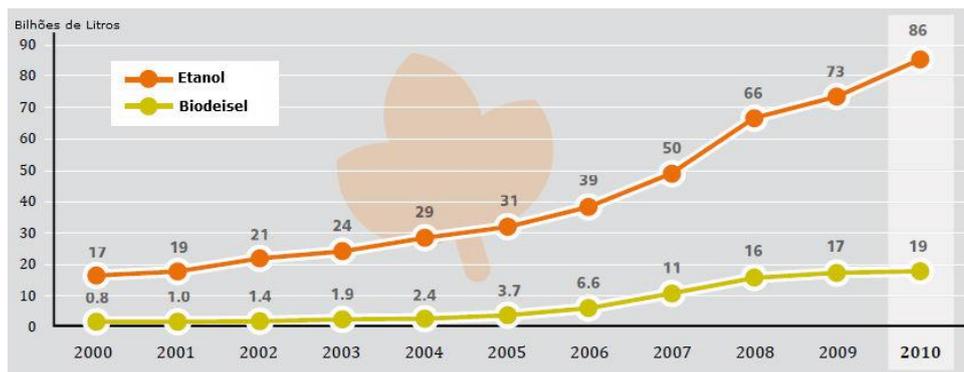


Figura 11: Produção mundial de etanol e biodiesel no período de 2000 a 2010 (adaptado de REN21, 2011).

A assinatura isotópica do carbono (¹³C/¹²C) para o etanol deve ser similar à da sua biomassa. No Brasil, esta assinatura deve ser similar à da cana-de-açúcar (Farquhar *et al.*, 1989; Martinelli *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2002;

Padovan *et al.*, 2003; Pissinatto *et al.*, 1999; Pupin *et al.*, 1998; Rossi, N. F. *et al.*, 1999; Silva, B. M. *et al.*, 1999; Sleiman *et al.*, 2008).

4.3. Açúcar

O açúcar, também conhecido como sacarose, é formado por uma molécula de glicose e uma de frutose, tendo os átomos de carbono C1 da glicose e C2 da frutose participando na ligação glicosídica. É produzido pela planta no momento da fotossíntese. Encontra-se em abundância na cana-de-açúcar, nas frutas e na beterraba. É produzido a partir de plantas C4, sendo assim, sua assinatura isotópica de carbono possui um valor médio de -13 ‰ (Farquhar *et al.*, 1989; Martinelli *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2002; Padovan *et al.*, 2003; Pupin *et al.*, 1998; Rossi, N. F. *et al.*, 1999; Silva, B. M. *et al.*, 1999; Sleiman *et al.*, 2008).

4.4. Metanol

O metanol ou álcool metílico é um composto químico encontrado na forma líquida, inflamável possuindo uma chama invisível. É altamente tóxico e pode ser fatal quando inalado, ingerido ou em contato com a pele. É absorvido rapidamente pelo organismo, pode provocar cegueira e parada cardíaca (Ferreira *et al.*, 1981; Secretaria Da Saúde).

É utilizado como solvente de tintas, vernizes, combustível, aditivos de gasolina, anticongelantes em radiadores, líquido de freios de veículos, fabricação de bebidas clandestinas. Sua produção pode ser através do petróleo, da madeira; pela fermentação de grãos; a partir de gás natural ou através da redução de CO ou CO₂ na presença de H₂ (Carrete Jr. *et al.*, 1994).

A assinatura isotópica vai depender da sua origem. Sua origem pode ser petrogênica, apresentando valores mais negativos de $\delta(^{13}\text{C})$.

4.5. Gasolina

A gasolina é o combustível, derivado de petróleo, mais utilizado mundialmente. É um combustível energético para motores de combustão interna com ignição por centelha, conhecido como ciclo Otto (Fernandes, 2009; Mendes, 2004).

A gasolina brasileira é constituída basicamente por hidrocarbonetos (compostos orgânicos que contém átomos de carbono e hidrogênio) e, em menor quantidade, por produtos oxigenados (produtos que possuem átomos de oxigênio em sua fórmula química, etanol). Os hidrocarbonetos que compõem a gasolina (hidrocarbonetos aromáticos, olefínicos e saturados) são mais "leves" do que aqueles que compõem o óleo diesel, pois são formadas por moléculas de menor cadeia carbônica (normalmente cadeias de 4 a 12 átomos de carbono) (Dupin *et al.*, 2010). Além dos hidrocarbonetos e dos oxigenados a gasolina contém compostos de enxofre, compostos de nitrogênio e de metais pesados em baixas concentrações (Dupin *et al.*, 2010).

A gasolina comum automotiva atualmente disponibilizada no Brasil é aquela que possui compostos oxigenados em sua composição, normalmente álcool etílico anidro, podendo a proporção ser de até 25% (ANP, 2011; Dupin *et al.*, 2010; Puerto Rico *et al.*, 2010).

Encontram-se na literatura diversos estudos a respeito da assinatura isotópica de carbono em combustíveis fósseis (Al-Aroui *et al.*, 1998; Louie *et al.*, 1993; Martin, 1984; Mazeas e Budzinski, 2001; Smallwood *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2010). Meier-Augenstein (1999) demonstra através de um gráfico (figura 4) uma faixa com os valores de $\delta(^{13}\text{C})$ encontrados na literatura para combustíveis fósseis (-51 a -22 ‰) e também para petróleo (-45 a -22 ‰).

5 Técnicas Utilizadas na Análise Isotópica

A principal técnica de análise para isótopos estáveis é a espectrometria de massas, existindo outras técnicas como: a ressonância magnética nuclear (RMN), que é uma técnica não destrutiva e é utilizada para avaliar a taxa $^2\text{H}/^1\text{H}$; a espectrometria de emissão (EM), para a análise de abundância isotópica de ^{15}N (Silva, 1999).

Uma técnica analítica que vem ganhando espaço no mercado é a baseada na espectroscopia de cavidade ressonante do tipo *ring-down* (ECRTRD). Ela é uma técnica baseada em laser, onde suas aplicações englobam medidas dos gases estufa e análise de isótopos estáveis (Crosson, 2008). Ao contrário dos espectrômetros de massa, estes analisadores exigem pouco ou nenhum tratamento da amostra. (Chen *et al.*, 2010; Crosson, 2008; Tomita *et al.*, 2006; Wahl *et al.*, 2006).

5.1. Espectrometria de Massas de Razões Isotópicas (EMRI)

A espectrometria de massas é uma poderosa ferramenta que foi usada, no princípio, na determinação de massas atômicas, através da separação de íons, positivos ou negativos, produzidos a partir de átomos ou moléculas de acordo com a razão massa/carga (m/q) (Atkins e Jones, 2006; Watson, 1997). Atualmente ela vem sendo empregada na busca de informações sobre a estrutura de compostos orgânicos, na análise de misturas orgânicas complexas, na análise elementar e na determinação da composição isotópica dos elementos. Trata-se do método mais usado para essa última finalidade (Roboz, 1968; Watson, 1997).

A espectrometria de massas de isótopos estáveis difere da espectrometria de massas convencional, pois permite a medição de abundâncias relativas de isótopos estáveis em uma amostra, proporcionando alta precisão e menor flexibilidade na discriminação de massas. Nela é determinada a diferença na

proporção de isótopos com maior precisão e exatidão do que a razão isotópica absoluta. A medida da razão isotópica do analito é dada em relação à medida da razão isotópica de um gás padrão ou de referência (Meier-Augenstein, 1999). Um EMRI constitui-se, basicamente, das seguintes partes: unidade de admissão ou de entrada para amostras gasosas; fonte de ionização; unidade aceleradora de íons; analisador magnético de íons; detector e programa processador dos dados (Brand, 1996; Meier-Augenstein, 1999; Werner e Brand, 2001).

No EMRI, o analito deve ser convertido em um gás, que deve ser isotopicamente representativo da amostra original (Benson *et al.*, 2006). Para que isso ocorra as amostras são submetidas à alta temperatura em tubo de combustão (Baskaran, 2011). As medidas das razões isotópicas de $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ são feitas através dos gases hidrogênio (H_2), nitrogênio (N_2), dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO_2) ou hexafluoreto de enxofre (SF_6), respectivamente (Benson *et al.*, 2006). Existem duas técnicas de introdução de amostra que são: de dupla entrada (DE-EMRI) e de fluxo contínuo (FC-EMRI). Ambas as técnicas requerem que as amostras, sejam elas sólidas, líquidas e gasosas, sejam convertidas em gases puros (Benson *et al.*, 2006).

O sistema DE (figura 12) foi introduzido por Urey em 1948 e descrito por McKinney *et. al* em 1950 (Werner e Brand, 2001). Nele as amostras a serem analisadas são preparadas separadamente (fora da linha). Este procedimento utiliza equipamentos específicos, tais como linhas de vácuo; bombas de compressão; concentradores; fornos de reação; e equipamentos de microdestilação, consumindo assim, muito tempo de trabalho. Usualmente necessita de grandes quantidades de amostra, e problemas como contaminação e fracionamento isotópico podem ocorrer em cada um dos procedimentos descritos. O gás de referência e o gás da amostra são introduzidos por vias diferentes, com isso consegue-se fazer comparações entre as composições isotópicas da amostra em relação ao gás de referência (Benson *et al.*, 2006).

No sistema FC-EMRI, um fluxo contínuo de gás de arraste carrega o gás produzido no analisador até a entrada do EMRI. As amostras a serem analisadas são preparadas em linha; são necessárias pequenas quantidades de amostra; as análises são simples e rápidas; e há a possibilidade de fazer interface com outras técnicas de preparação, tais como: análise elementar (AE), cromatografia

gasosa (CG), e cromatografia líquida (CL). Os sistemas AE e o CG, que são os mais utilizados (Benson *et al.*, 2006; Kelly e Rhodes, 2002).

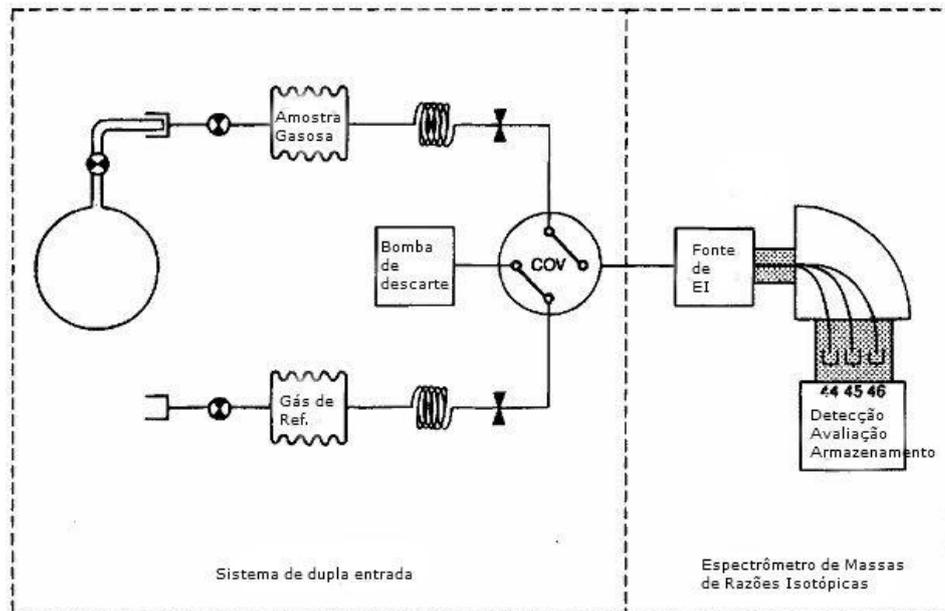


Figura 12: Representação esquemática de um sistema com dupla entrada para determinações isotópicas precisas (adaptado de Brand, 1996).

Em espectrômetros de massa acoplados com analisadores elementar de CNHS (AE-EMRI); são feitas determinações de teores destes elementos em amostras minerais e orgânicas, além da razão isotópica do elemento de interesse (Brand, 1996; Grassineau, 2006; Kelly e Rhodes, 2002; Meier-Augenstein, 1999). Um diagrama esquemático de um AE-EMRI pode ser observado através da figura 13.

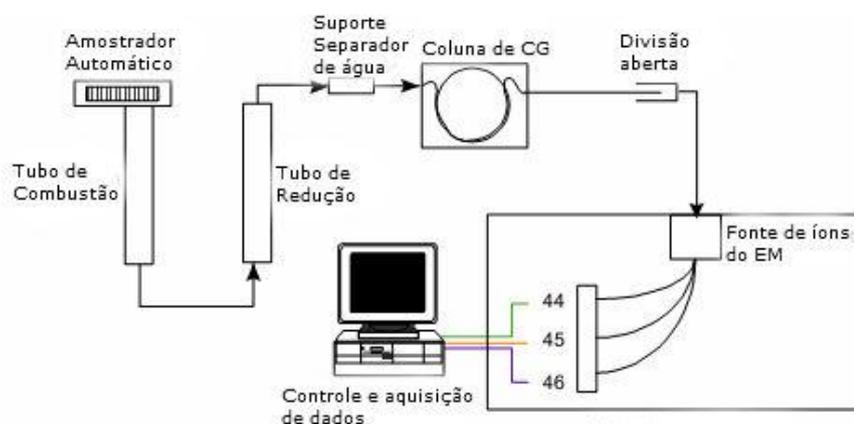


Figura 13: Diagrama esquemático de um analisador elementar acoplado a um espectrômetro de massas de razões isotópicas (AE-EMRI) (adaptado de Kelly, 2002).

O sistema CG-EMRI foi introduzido na década de 1970 por Sano *et. al* em 1976, e por Matthews e Hayes em 1978 (Baskaran, 2011; Werner e Brand, 2001). Meier-Augenstein (1999) cita que Barrie *et al.* em 1984 utilizou um sistema de cromatógrafo gasoso com uma interface de combustão acoplada a um espectrômetro de massa de razões isotópicas (CG-C-EMRI), que foi o primeiro sistema genuíno da época. A interface de combustão se deve à necessidade de se converter a amostra em gás, assim, o efluente do GC é introduzido num reator de combustão. Somente após 1990 que o instrumento começou a ser comercializado (Baskaran, 2011; Meier-Augenstein, 1999).

Em um CG-EMRI os componentes da amostra depois de serem eluídos da coluna do CG passam através de um reator de combustão, que pode estar preenchido com CuO/Pt ou CuO/NiO/Pt, onde são queimados a CO₂ e água, a uma temperatura de aproximadamente 820 ou 940 °C. O vapor de água gerado durante a combustão é removido através de uma armadilha de captura de água, pois este vapor pode protonar o CO₂ e com isso gerar resultados falsos (Baskaran, 2011; Meier-Augenstein, 1999). O CO₂ é direcionado para o espectrômetro de massas de razões isotópicas onde a proporção relativa de ¹³CO₂ e de ¹²CO₂ são determinadas e os valores de δ(¹³C) são calculados para cada componente (Baskaran, 2011; Ghidini *et al.*, 2006). Como foi descrito no capítulo 1, os resultados de δ são expressos através da eq. 6. Quando se acopla o EMRI ao sistema CG, obtêm-se análises isotópicas altamente precisas, especialmente ao nível de abundância isotópica natural. Diversas aplicações utilizando esta técnica foram citadas no capítulo 3 deste trabalho. Através da figura 14 pode-se observar um esquema de um CG-EMRI usando o sistema de fluxo contínuo.

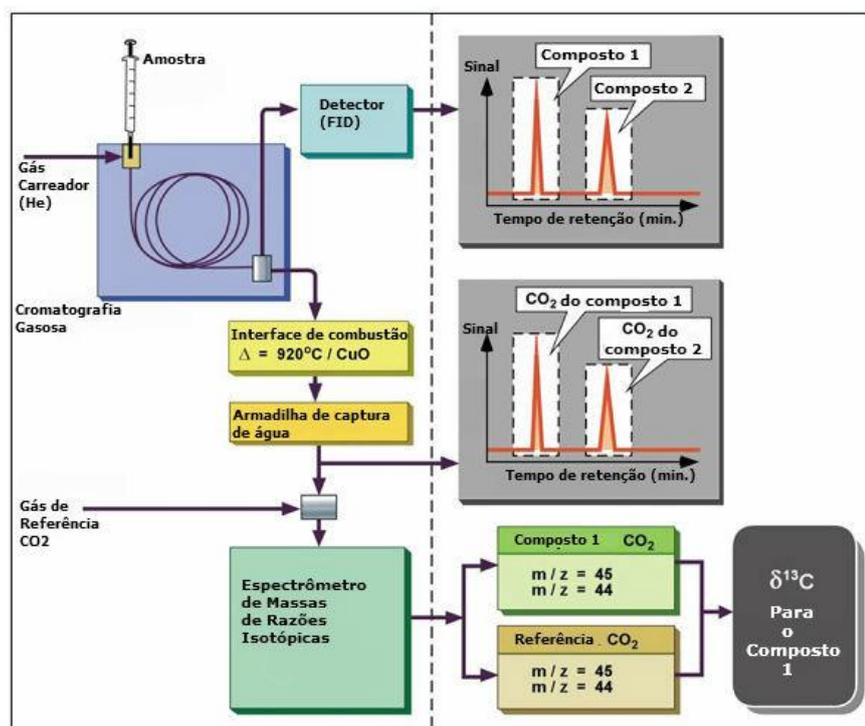


Figura 14: Representação esquemática de um CG-EMRI trabalhando em modo de fluxo contínuo. (adaptado de Baskaran, 2012)

5.2. Espectroscopia de Cavidade Ressonante Tipo Ring-Down (ECRRD)

5.2.1. Breve Histórico

A espectroscopia de cavidade ressonante do tipo *ring-down* (ECRRD) é uma técnica baseada em absorção óptica linear a laser, onde uma amostra de gás é introduzida em uma cavidade óptica de alta sofisticação e a absorbância óptica da amostra é medida, proporcionando a concentração ou medidas da razão isotópica de uma espécie de gás (figura 15) (Crosson, 2008; Crosson, 1999; Lehmann e Romanini, 1996; O'keefe e Deacon, 1988; Paldus e Kachanov, 2005; Spence *et al.*, 2000; Zalicki e Zare, 1995).

Esta técnica vem ganhando popularidade devido a sua fácil implementação e sensibilidade (Spence *et al.*, 2000). Uma das principais vantagens da CRDS sobre as demais técnicas tradicionais de espectroscopia é o seu extenso caminho óptico, fazendo com que a técnica se torne muito eficaz, tornando sua sensibilidade extremamente alta (Crosson, 2008; Berden, G. *et al.*, 2000).

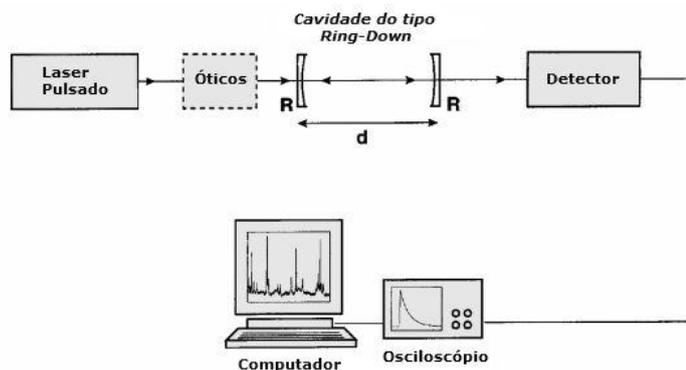


Figura 15: Esquema experimental de um CRDS (adaptado de Berden, 2000).

Paldus e Kachanov (2005) realizaram um levantamento histórico sobre a técnica, onde é apresentado um panorama histórico de métodos espectroscópicos utilizando laser. O trabalho relata o lançamento das cavidades óticas em 1974, o que proporcionou as primeiras medidas de refletividade em 1980. A primeira aparição da técnica CRDS foi em 1988 através de estudos realizados por O'Keefe e Deacon, onde a sensibilidade da técnica foi demonstrada pela medida de várias bandas de transição fracas e proibidas, $\Sigma_g^- - X \Sigma_g^-$, em moléculas gasosas de oxigênio. A figura 16 mostra o esquema operacional que O'Keefe e Deacon (1988) utilizaram.

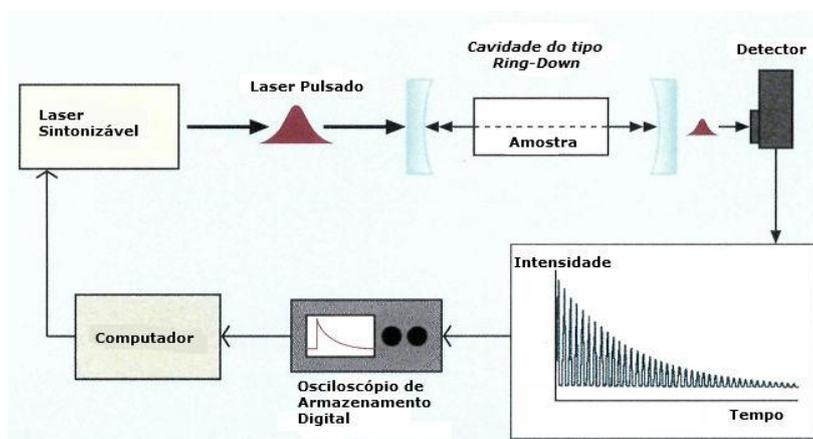


Figura 16: Esquema operacional baseado no modelo utilizado por O'Keefe e Deacon em 1988 (adaptado de Paul e Saykally, 1997).

Esta técnica também é conhecida por outros nomes, tais como: espectroscopia de absorção a laser de cavidade ressonante do tipo *ring-down* (EALCRRD), e também como espectroscopia de cavidade *leak-out* (CALOS) (O'keefe, 1998; Paldus e Kachanov, 2005; Paul e Saykally, 1997). Há quatro tipos de esquemas mais utilizados experimentalmente, que são: ECRRD

pulsado, ECRRD de onda contínua (ECRRD-OC); ECRRD de deslocamento de fase (ECRRD-DF) e espectroscopia de cavidade de absorção intensificada (ECAI) (Berden, G. *et al.*, 2009; Paldus e Kachanov, 2005). Estes esquemas estão apresentados na figura 17.

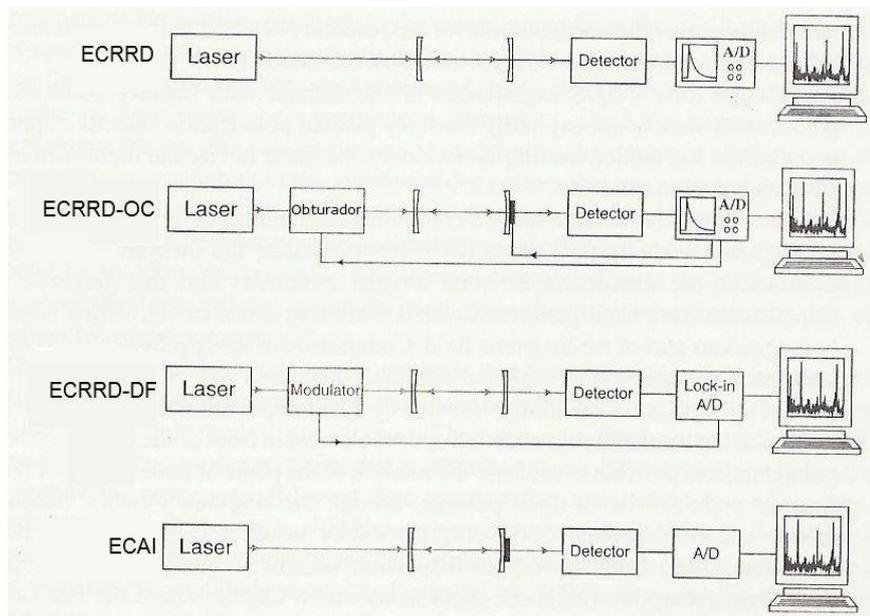


Figura 17: Esquema dos quatro tipos mais comuns de CRDS (adaptado de Berden e Engeln, 2009).

5.2.2. Princípios de Operação do ECRRD

A espectroscopia de cavidade ressonante do tipo *ring-down* é baseada no princípio de medir a taxa de decaimento da intensidade de luz dentro de um ressonador ótico estável, que é muitas vezes chamado de cavidade do tipo *ring-down* (CRD) (Berden, G. *et al.*, 2009; Crosson, 2008; Paldus e Kachanov, 2005; Romanini et al., 1997; Romanini et al., 1997).

A luz de um laser é primeiramente injetada na CRD, e depois é interrompida. Isto é feito com a câmara vazia, sem amostra. A onda transmitida decai exponencialmente com o tempo. A taxa de decaimento é proporcional à perda ótica total dentro da CRD. A luz que circula no interior da CRD é refletida e transmitida pelos espelhos em cada ida e volta, e pode ser monitorada através de um fotodetector colocado atrás de um dos espelhos da cavidade. A constante de decaimento, também chamada de tempo tipo *ring-down*, é medida como uma

função do comprimento de onda do laser para obter um espectro da perda na cavidade (Crosson, 2008; Paldus e Kachanov, 2005; Paul *et al.*, 2001). A figura 18 mostra um diagrama de blocos com os componentes básicos de um sistema CRDS,

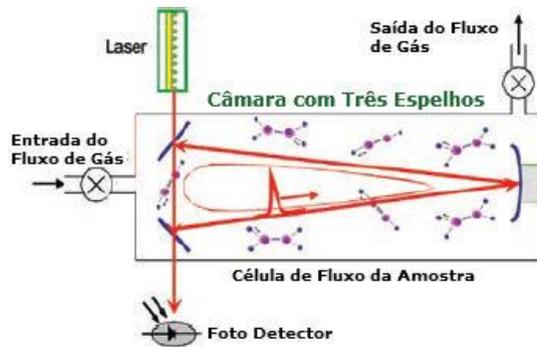


Figura 18: Diagrama de bloco dos componentes básicos de um esquema CRDS (adaptado de Crosson, 2008).

Quando a câmara de amostra é preenchida com um gás absorvente, a luz total perdida ao circular dentro da cavidade é proporcional à perda devido à propagação da luz pelos espelhos e também pela luz absorvida pelas moléculas, em uma faixa de comprimento de onda correspondente a uma característica de absorção da amostra. Assim, obtém-se o coeficiente de absorção absoluto, da amostra, podendo facilmente calcular a concentração da amostra (Berden, G. *et al.*, 2009; Crosson, 2008; Paldus e Kachanov, 2005). A concentração da espécie do gás de interesse é proporcional aos picos do seu espectro característico. A figura 19 mostra as sequencias temporais dos pulsos deixando a cavidade, quando esta está (a) vazia e (b) quando está preenchida por um gás absorvente. Nota-se que o decaimento da luz circulando dentro da câmara com uma amostra é mais rápido do que em uma cavidade vazia (figura 20). Assim, a taxa de decaimento da luz é regida pela perda total na cavidade (Crosson, Berden, G. *et al.*, 2009; 2008).

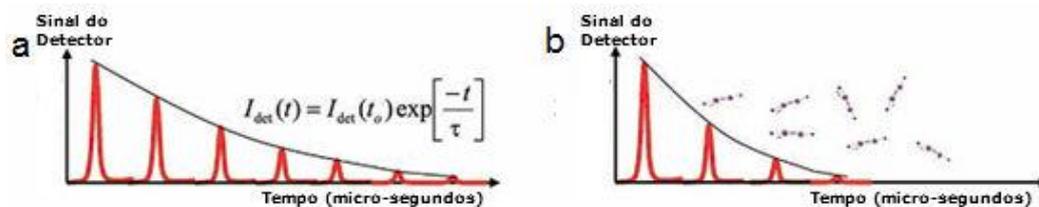


Figura 19: a) Sequencia temporal dos pulsos deixando a cavidade, quando esta está vazia. b) Sequencia temporal deixando a cavidade quando se adiciona um gás absorvente à cavidade (adaptado de Crosson, 2008).



Figura 20: Intensidade da luz vista pelo fotodetector, quando o laser é desligado, em dois diferentes momentos, primeiro quando a cavidade se encontra vazia e num outro momento quando há amostra na cavidade (adaptado de Crosson, 2008).

5.2.2.1.

Princípio de Operação do equipamento π TOC-CRDS

O analisador isotópico π TOC-CRDS combina um analisador de carbono orgânico total (TOC) da OI Analytical com um espectrômetro de cavidade ressonante do tipo *ring-down* (CRDS) G1101-*i* da Picarro. Este sistema permite a análise de medidas de carbono orgânico total (TOC), carbono inorgânico total (TIC), ou de carbono total (TC) em amostras sólidas ou líquidas juntamente com a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ expressa como $\delta(^{13}\text{C})$ versus Vienna PDB.

O analisador G1101-*i* da Picarro é baseado a laser, emprega a tecnologia de cavidade ressonante para medir a abundância isotópica $\delta(^{13}\text{CO}_2)$. A abundância isotópica é quantificada através da medição de duas linhas de absorção espectrais independentes na região do infravermelho próximo do espectro, uma para ^{12}C e outra para ^{13}C . A relação das alturas dos picos das linhas espectrais é uma medida da razão entre as concentrações de cada um

dos isótopos. As linhas não são medidas simultaneamente, o laser alterna a medida entre as duas linhas a cada 8 segundos.

5.2.2.1.1.

Princípio de Operação do Módulo de Análises de Amostras Líquidas (Modelo: OI Analytical Aurora 1030W)

No método utilizado, NPOC, os compostos orgânicos presentes em amostras aquosas (1) são oxidados na câmara de reação do analisador de TOC Aurora 1030W (2) usando persulfato de sódio 5% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) aquecido em temperaturas de até 100 °C. O gás CO_2 resultante é medido por um detector de infravermelho de estado sólido não dispersivo (SSNDIR), e relatado na forma de massa e de concentração de carbono.

Compostos de carbono inorgânico (carbonatos e bicarbonatos) em amostras aquosas (1) são acidificados na câmara de reação do analisador de carbono orgânico total, TOC Aurora 1030W (2) usando ácido fosfórico 10% (H_3PO_4). O carbono inorgânico é convertido em CO_2 , que é então medido por um detector de infravermelho de estado sólido não dispersivo (SSNDIR) e relatado na forma de massa e de concentração de carbono.

As reações que ocorrem quando se utiliza o método NPOC são:

- $\text{H}_3\text{PO}_4 \leftrightarrow 3\text{H}^+ + \text{PO}_4^{-3}$
- $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Na}^+ + \text{NaHCO}_3$
- $\text{NaHCO}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$
- $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

O gás CO_2 ao sair do detector SSNDIR (2) é coletado em um saco amostrador de gás, localizado no Módulo Sólidos 1030S (3). O gás é diluído e uma alíquota é enviada para o espectrômetro de cavidade ressonante tipo *ring-down* (CRDS) Picarro G1101-*i* para a medição da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (4). O coletor de diluição de gás dentro do Módulo Sólidos 1030S controla a razão de separação do gás que entra no CRDS para manter a concentração de gás dentro de uma faixa precisa de medição de $\delta(^{13}\text{C})$. O programa do equipamento reúne todos os dados das medidas realizadas e gera um relatório (5). Todo o procedimento descrito acima pode ser observado através da figura 21.

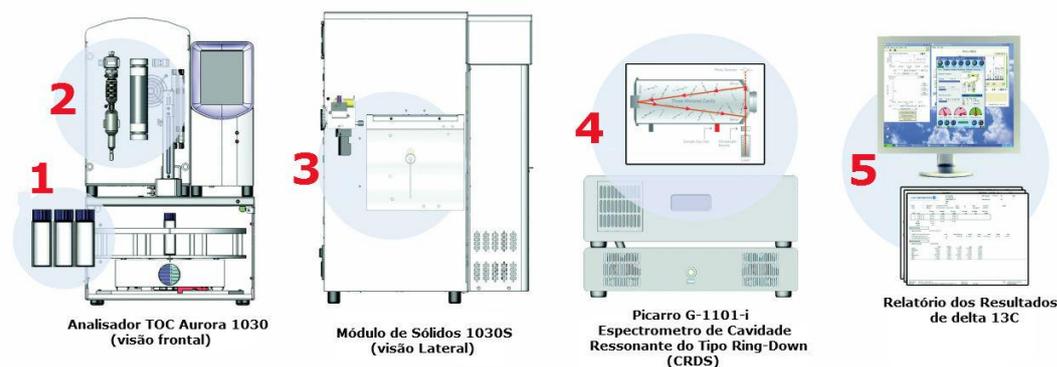


Figura 21: Princípio de operação – Amostras líquidas (Fonte: OI Analytical Application Note #35190710, 2011).

5.2.2.1.2.

Princípio de Operação do Módulo de Análises de Amostras Sólidas (Modelo: OI Analytical Solids 1030S)

As amostras sólidas são pesadas em um cadinho de quartzo, com o auxílio de uma balança analítica, e colocado no mecanismo de elevação do Módulo de Sólidos 1030S (1). A amostra é levada para dentro do tubo de combustão e aquecida a 900 °C no interior do forno. O oxigênio é introduzido em uma taxa constante para haver uma combustão catalítica a alta temperatura. A matéria orgânica presente na amostra é oxidada e convertida em CO₂, que é recolhida no saco coletor de gás (2).

Uma alíquota de gás CO₂ da amostra é transferida para o detector SSNDIR no analisador TOC Aurora 1030W para a medição da massa de carbono na amostra (3). Uma amostra do gás que está dentro do saco coletor é transferida para o Picarro G1101-i CRDS para a medição da proporção de isótopos ¹³C/¹²C (4).

O coletor de diluição de gás dentro do Módulo Sólidos 1030S controla a razão de separação do gás que entra no CRDS para manter a concentração de gás dentro de uma faixa precisa de medição de δ(¹³C). O programa do equipamento reúne todos os dados das medidas realizadas e gera um relatório (5). Todo o procedimento descrito acima pode ser observado através da figura 22.

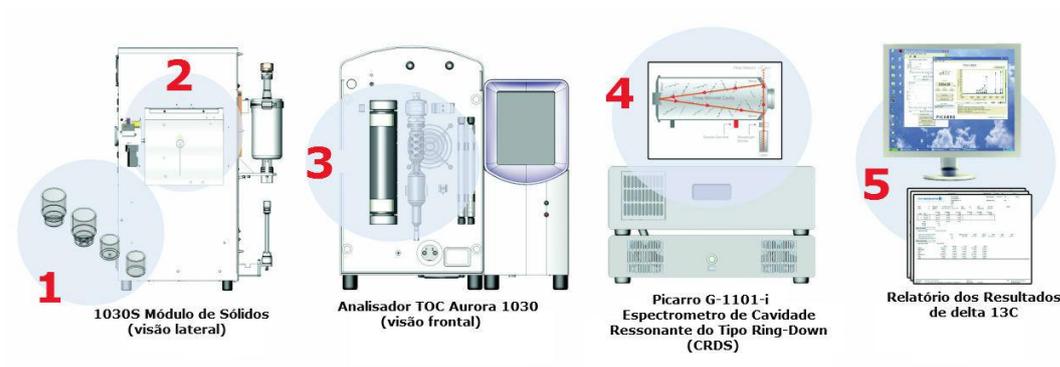


Figura 22: Princípio de operação – Amostras sólidas (Fonte: OI Analytical Application Note #35190710).

6 Materiais e Métodos

6.1. Materiais

- Balão volumétrico de 1 L;
- Cadinhos de quartzo de 1 mL;
- Lã de quartzo;
- *Vials* de 40 mL;
- Espátula;
- Micro seringa de 100 µL;
- Pipeta volumétrica de 100 µL;
- Pipeta volumétrica de 200 µL;
- Pipeta volumétrica de 500 µL;

6.2. Reagentes

- Água ultra pura, tipo MilliQ;
- Ácido fosfórico (Vetec);
- Biftalato de potássio (Vetec);
- Persulfato de sódio (Vetec).

6.3. Instrumentação e Equipamentos

- Analisador de carbono orgânico total (TOC), OI Analytical Aurora modelo 1030, acoplado a um espectrômetro de cavidade ressonante do tipo *ring-down* (CRDS), Picarro G1111-*i*,
- Amostrador automático, OI Analytical modelo 1088;
- Analisador elementar (EA), Flash modelo 1112, acoplado a um espectrômetro de massas de razões isotópicas, Thermo modelo Delta V Plus;
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo MX5;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AY220.

6.4. Planejamento Experimental

Um planejamento experimental foi realizado, através do programa Design-expert, visando otimizar as condições operacionais do módulo de líquidos do analisador de TOC (OI Analytical Aurora 1030W).

6.5. Metodologia

As metodologias aplicadas para a análise de sólidos e líquidos seguem as recomendações do fabricante do equipamento.

6.5.1. Condições Operacionais

Os parâmetros operacionais utilizados no módulo de sólidos (OI Analytical Solids modelo 1030S) foram os indicados pelo fabricante, não sendo necessária a utilização de um planejamento experimental para otimizar tais parâmetros. As condições operacionais utilizadas no módulo de sólidos (OI Analytical Solids modelo 1030S) estão descrita na tabela 4. A faixa de trabalho em quantidade de carbono para este módulo é de 100 ppb a 30.000 ppm.

Tabela 4: Condições operacionais do *t*TOC-CRDS para a análise de amostras no módulo de sólidos (OI Analytical Solids modelo 1030S).

Analisador TOC 1030S	
Volume da amostra de gás	8 mL
Velocidade de dispersão da seringa	70%
Detector do TOC	NDIR
Tempo de Detecção do TOC	5 min
Módulo Sólidos 1030S, Módulo de Diluição de Gás	
Temperatura do forno	900 °C
Tempo de combustão	4 min
Fração de injeção inicial	8 mL
Concentração de CO ₂ a ser alcançada pelo CRDS	3500 ppmv
Duração do <i>sniff</i> da amostra	3 min
Retorno à linha de base	3 min
Duração do pulso da amostra	8 min

No caso das amostras líquidas, as condições operacionais utilizadas no módulo de líquidos (OI Analytical Aurora modelo 1030W), descritas na tabela 5, foram obtidas após a otimização realizada através de um planejamento experimental do tipo D-ótimo. A faixa de trabalho em quantidade de carbono para este módulo é de 2 ppb a 30,000 ppm.

Tabela 5: Condições operacionais do τ TOC-CRDS para a análise de amostras no módulo de líquidos (OI Analytical Aurora modelo 1030W).

Analisador TOC 1030W	
Volume da amostra de gás	4 mL
Volume de ácido fosfórico 10%	2 mL
Volume de persulfato de sódio 5%	2 mL
Temperatura da câmara de reação	100 °C
Velocidade de dispersão da seringa	40%
Detector do TOC	NDIR
Tempo de Reação do TOC	4 min
Tempo de Detecção do TOC	3 min
Módulo Sólidos 1030S, Módulo de Diluição de Gás	
Concentração de CO ₂ a ser alcançada pelo CRDS	3500 ppmv
Duração do <i>sniff</i> da amostra	3 min
Retorno à linha de base	3 min
Duração do pulso da amostra	8 min

6.5.2. Calibração do Espectrômetro de Cavidade Ressonante do Tipo *Ring-Down Picarro G1101-i*

Para a construção da curva de calibração do CRDS foram utilizados três MRC's sólidos. Para a primeira curva de calibração foram utilizados os MRC's ácido l-glutâmico, sacarose e cafeína. Já para a segunda curva de calibração foram utilizados os MRC's ácido l-glutâmico, sacarose e celulose. As análises dos MRC's foram realizadas em triplicata. Os MRC's utilizados foram obtidos através da *International Atomic Energy Agency* (IAEA).

6.5.3. Critérios de Desempenho da Metodologia Analítica

A validação de uma metodologia é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos. Os parâmetros de validação dos métodos utilizados no presente trabalho foram calculados de acordo com o documento orientativo “Orientação sobre validação de métodos analíticos” do INMETRO (DOQ-CGCRE-008, 2011).

6.5.3.1. Linearidade

A linearidade mede a variação da tendência para diferentes valores de referência na faixa de interesse. É avaliada através da inclinação da reta formada pelos diferentes valores de referência em relação a respectiva tendência (Hair *et al.*, 2009). Neste trabalho, o modelo matemático foi calculado através da regressão linear, pelos resíduos e pelo coeficiente de correlação linear (r).

6.5.3.2. Precisão

A precisão é utilizada para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la é através da repetitividade e da reprodutibilidade. É geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo, conforme a equação abaixo:

$$DPR = \frac{DP}{DMD} X 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

onde DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão dos resultados obtidos e DMD é o valor médio de $\delta(^{13}\text{C})$ obtido.

Neste trabalho a precisão será expressa na forma de desvio padrão (valor absoluto), pois os valores de $\delta(^{13}\text{C})$ já são expressos como valores relativos.

6.5.3.2.1. Repetitividade

Para determinar a repetitividade do método, expressou-se o resultado como estimativa do desvio padrão (DP), com sete repetições de uma mesma amostra, sob as mesmas condições.

6.5.3.2.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.

A reprodutibilidade foi calculada utilizando o valor médio dos desvios padrão de diferentes amostras analisadas em vários dias.

6.5.3.3. Exatidão

A exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Neste trabalho, para avaliar a exatidão do método, optou-se por utilizar materiais de referência certificados e também comparar alguns resultados obtidos com os obtidos através de outra técnica.

6.5.3.3.1. Materiais de Referência Certificados (MRC's)

No processo de validação, sempre que possível, deve-se utilizar materiais de referência certificados (MRC's).

Durante o presente trabalho foram utilizados MRC's para fazer a curva de calibração do CRDS e também para fazer a verificação da calibração ao longo das análises. Os MRC's utilizados estão listados na tabela 6.

Tabela 6: MRC's utilizados.

Código	Substância	$\delta(^{13}\text{C})$, (‰)
USGS-41	Ácido L-glutâmico	37,626
Urea#2	Ureia	-8,02
IAEA-CO-8	Calcita	-5,764
IAEA-CH-6	Sacarose	-10,449
IAEA-CH-3	Celulose	-24,724
IAEA-600	Cafeína	-27,771
NBS-22	Óleo	-30,031

Somente os MRC's sacarose e ureia foram utilizados no módulo de líquidos, pois eles são solúveis em água, com isso, soluções com concentração de carbono conhecidas podem ser preparadas a partir desses padrões. Soluções estas empregadas na construção da curva de calibração do analisador de carbono da OI Analytical.

Foram preparadas soluções padrão de concentração de 5 g L⁻¹ de C a partir dos padrões de sacarose e de ureia, com o auxílio de balança analítica (Shimadzu, modelo AY220) e água ultra pura.

Os valores obtidos de $\delta(^{13}\text{C})$ foram comparados com os valores certificados do material de referência utilizando os critérios de decisão: erro relativo e índice z (z-score).

6.5.3.3.1.1. Erro relativo (ER)

O erro relativo (ER) é expresso em porcentagem por meio da equação a seguir:

$$ER = \frac{X_{lab} - X_{MRC}}{X_{MRC}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

onde X_{lab} é o valor de $\delta(^{13}\text{C})$ obtido pelo laboratório e X_{MRC} é o valor de $\delta(^{13}\text{C})$ certificado do MRC.

6.5.3.3.1.2. Índice z (z-score)

O índice z é calculado através da equação a seguir:

$$z = \frac{(X_{lab} - X_{MRC})}{s} \quad (\text{Eq. 9})$$

onde X_{lab} é o valor de $\delta(^{13}\text{C})$ obtido pelo laboratório; X_{MRC} é o valor de $\delta(^{13}\text{C})$ certificado do MRC, e s o desvio-padrão do ensaio.

A avaliação é feita com o seguinte critério de avaliação:

$|z| \leq 2 \rightarrow$ resultado satisfatório;

$2 < |z| < 3 \rightarrow$ resultado questionável;

$|z| \geq 3 \rightarrow$ resultado insatisfatório.

6.5.3.3.2. Comparação da Precisão entre Métodos

Consiste na comparação dos resultados obtidos utilizando um método a ser validado com os resultados conseguidos por meio de um método de referência validado. Desta forma avalia-se a exatidão do método em processo de validação com o de referência.

Neste trabalho, os resultados obtidos pelo método a ser validado foram comparados com os resultados obtidos pelo laboratório LABMAM através do EA-IRMS. As análises foram realizadas em triplicata. As médias dos resultados obtidos através das duas técnicas foram comparadas utilizando o teste “*t student*” para verificar se elas são estatisticamente iguais. O teste *t* é calculado através da equação abaixo:

$$t_{calculado} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (\text{Eq. 10})$$

onde:

\bar{x}_1 e \bar{x}_2 = as médias dos valores de $\delta(^{13}\text{C})$ do analito obtidas através do método 1 e 2;

n_1 e n_2 = são as repetições da amostra utilizadas pelos métodos 1 e 2

s^2 é obtido através da equação a seguir:

$$s^2 \left(\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{(n_1+n_2-2)} \right) \quad (\text{Eq. 11})$$

onde:

s_1 e s_2 = os desvios-padrão dos valores de $\delta(^{13}\text{C})$ do analito obtidas através dos métodos 1 e 2.

Além dessa comparação, fez-se também uma comparação dos resultados obtidos pelo LABMAM e pelo LABAGUAS, com os obtidos pela PICARRO. A PICARRO utilizou outro tipo de CRDS. Para tal comparação, fez-se uma análise de variância (ANOVA de fator único).

6.5.3.4. Incerteza de Medição

É um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentalmente atribuídos ao mensurando. A incerteza da medição não implica em dúvida quanto à validade de uma medição; ao contrário, o conhecimento da incerteza implica numa maior confiança na validade do resultado de uma medição (EURACHEM, 2002).

A incerteza do resultado de uma medição reflete a falta de conhecimento exato do valor do mensurado. O resultado de uma medição, após correção dos efeitos sistemáticos conhecidos, é, ainda, tão somente uma estimativa do valor do mensurando, por causa da incerteza proveniente dos efeitos aleatórios e da correção imperfeita do resultado para efeitos sistemáticos. Os fenômenos que contribuem para a incerteza do resultado de uma medição e, conseqüentemente, para que o resultado de uma medição não possa ser caracterizado por um único valor são denominados de fontes de incerteza (EURACHEM, 2002).

A incerteza do resultado decorrente de uma medição normalmente é decorrente de vários componentes, que podem ser agrupados de acordo com as características do método usado para estimar seus valores numéricos. A incerteza total é a soma das incertezas geradas pelos diversos componentes do procedimento de medição, expressos como um desvio-padrão (EURACHEM, 2002).

Neste trabalho, os cálculos das incertezas de medição foram baseados no Guia EURACHEM – Determinando a incerteza na medição analítica (2002).

Na determinação do $\delta(^{13}\text{C})$ foram identificadas as seguintes fontes de incerteza (figura 23).

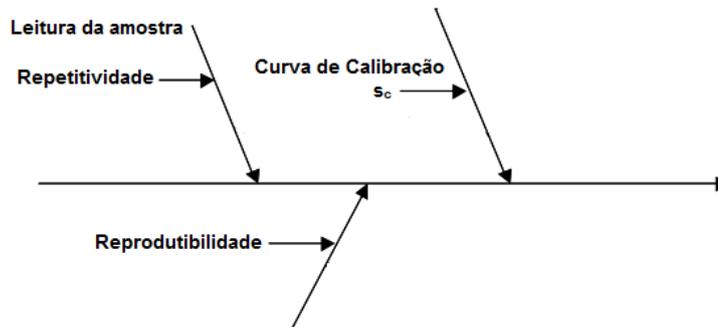


Figura 23: Espinha de peixe (diagrama causa-efeito) para a determinação do $\delta(^{13}\text{C})$.

A equação da curva de calibração pode ser expressa como

$$y = m\bar{x} + b \quad (\text{Eq. 12})$$

onde:

y = valores de $\delta(^{13}\text{C})$ esperados, ‰;

\bar{x} = valores de $\delta(^{13}\text{C})$ obtidos, ‰;

m = a inclinação da linha;

b = intercepto.

Desta forma, a incerteza da curva de calibração é expressa por

$$u_c = \sqrt{s_b^2 + \bar{x}s_m^2 + ms_x^2} \quad (\text{Eq. 13})$$

onde:

u_c = incerteza da curva de calibração;

\bar{x} = valor médio de x ;

m = a inclinação da linha;

s_b = desvio padrão de b ;

s_m = desvio padrão de m ;

s_x = desvio padrão de x .

Nota-se que, u_c já inclui a repetitividade da leitura da amostra ($S_{\bar{x}}$).

A incerteza combinada da medição leva em consideração, também, a reprodutibilidade (u_{repro}) (Eq. 14):

$$u_y = \sqrt{u_c^2 + u_{repro}^2} \quad (\text{Eq. 14})$$

onde:

u_y = incerteza combinada da medição;

u_c = incerteza da curva de calibração

u_{repro} = incerteza da reprodutibilidade.

A incerteza expandida (U) foi calculada para um intervalo de confiança de 95%, segundo a equação abaixo:

$$U = k * u_y \quad (\text{Eq. 15})$$

onde:

k = um fator de abrangência em um dado nível de confiança;

u_y = incerteza combinada.

Quando o número de repetições for maior do que 6, recomenda-se que k corresponda a 2. Quando a incerteza combinada baseia-se em observações estatísticas com poucos graus de liberdade (menos que 6), a escolha de k então depende do número efetivo de graus de liberdade. Quando isto ocorre recomenda-se que k seja igual ao valor bi-caudal de t de Student, para o número de graus de liberdade associado a essa contribuição, e para o nível de confiança exigido.

Para determinar o valor de t de Student a ser utilizado, calcula-se o valor do grau de liberdade efetivo, que é o número de graus de liberdade associado à incerteza padrão combinada, utilizando a equação de Welch-Satterthwaite:

$$v_{ef} = \frac{(u_y)^4}{\sum_{i=1}^n \frac{(u_i)^4}{v_i}} \quad (\text{Eq. 15})$$

onde:

v_{ef} = número de graus de liberdade efetivo;

u_y = incerteza combinada;

u_i = relacionado às incertezas associadas às leituras;

v_i = número de graus de liberdade associado a cada incerteza.

6.5.4. Amostragem e Preservação

As amostras de biomassas e de bio-óleo de serragem foram obtidas com o laboratório LABMAM. As biomassas obtidas foram: bagaço de cana; capim elefante, lignina e serragem. As amostras de etanol combustível e gasolina comum comercial foram obtidas com a Profa. Maria Isabel Pais da Silva, sendo estas oriundas do Programa de Monitoramento de Qualidade de Laboratórios no ES. A amostra de açúcar utilizada foi da marca União. As amostras de metanol utilizadas foram da marca Vetec, Mallinckrodt, Fluka, Merk e MTEDIA. Todas as amostras utilizadas não precisaram de tratamento prévio para o presente trabalho.

6.5.5. Análise das Biomassas e do Bio-óleo

Foram pesadas aproximadamente 3 mg das amostras de biomassa em cadinho de quartzo contendo lã de quartzo, utilizando balança analítica (Mettler Toledo, modelo MX5). Já para o bio-óleo de serragem foi pesado aproximadamente 5 mg da amostra. Feito isso, as amostras foram introduzidas no módulo de sólidos do TOC (OI Analytical Solids modelo 1030) para a realização das análises em triplicata. O fluxograma do processo analítico descrito para a realização das análises em amostras de biomassa e de bio-óleo se encontra na figura 24 e 25, respectivamente.

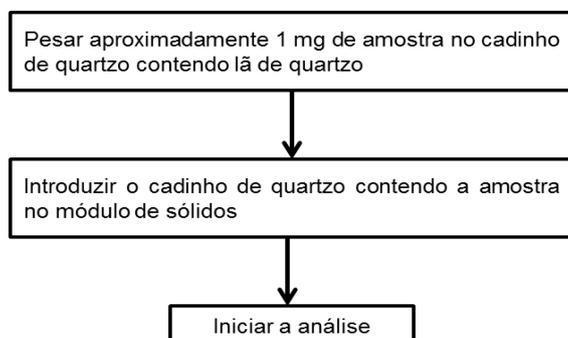


Figura 24: Fluxograma do processo analítico das amostras de biomassa.

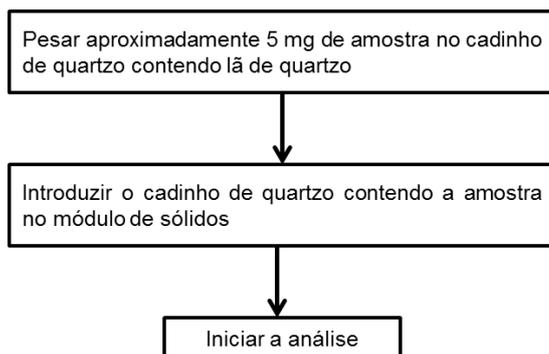


Figura 25: Fluxograma do processo analítico da amostra de bio-óleo.

6.5.6. Análise do Biocombustível

A amostra de etanol foi analisada através do módulo de líquidos do TOC (OI Analytical Aurora 1030W). Uma alíquota de 10 μL da amostra é retirada, com o auxílio de uma microseringa de 100 μL , e transferida para um *vial* contendo 40 mL de água ultra pura. O *vial* é introduzido no amostrador automático do TOC (OI Analytical modelo 1088). Foram realizadas diversas análises do etanol, em dias diferentes. O fluxograma do processo analítico descrito para a realização das análises em amostras de etanol se encontra na figura 26.

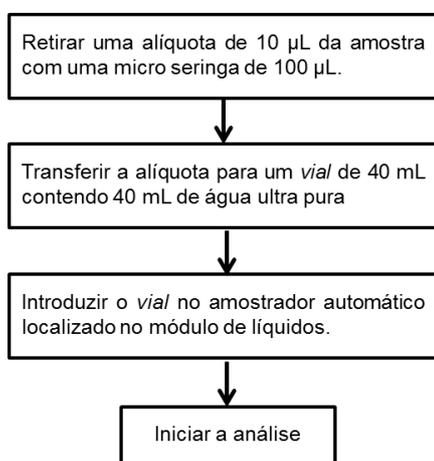


Figura 26: Fluxograma do processo analítico das amostras de etanol.

6.5.7. Análise de Açúcar

Foi preparada uma solução de 10.000 mg L^{-1} de C, com água ultra pura, a partir da amostra de açúcar, com o auxílio de uma balança analítica (Shimadzu, modelo AY220) e de um balão volumétrico de 1L. A partir desta solução mãe, foi preparada uma solução de 100 mg L^{-1} de C, com o auxílio de uma micropipeta

de 200 μL . A solução foi preparada diretamente no *vial* de 40 mL. A amostra foi analisada através do módulo de líquidos do TOC (OI Analytical Aurora 1030W). Foram realizadas diversas análises da amostra em dias diferentes. O fluxograma do processo analítico descrito para a realização da análise em amostra de açúcar se encontra na figura 27.

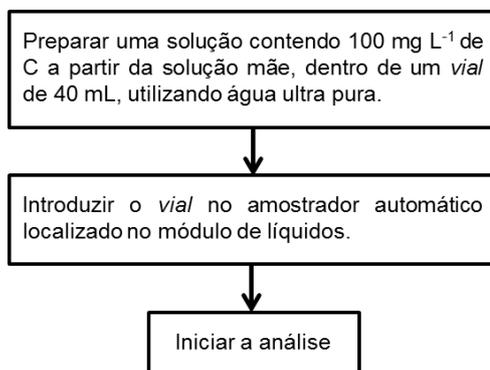


Figura 27: Fluxograma do processo analítico da amostra de açúcar.

6.5.8. Análise de Metanol

As amostras de metanol foram analisadas através do módulo de líquidos, TOC Aurora 1030W. Uma alíquota de 20 μL da amostra é retirada, com o auxílio de uma microseringa de 100 μL , e transferida para um *vial* contendo 40 mL de água ultra pura. Este *vial* é introduzido no amostrador automático do TOC (OI Analytical modelo 1088). Foram realizadas diversas análises das amostras de metanol, em dias diferentes. O fluxograma do processo analítico descrito para a realização das análises em amostras de metanol se encontra na figura 28.

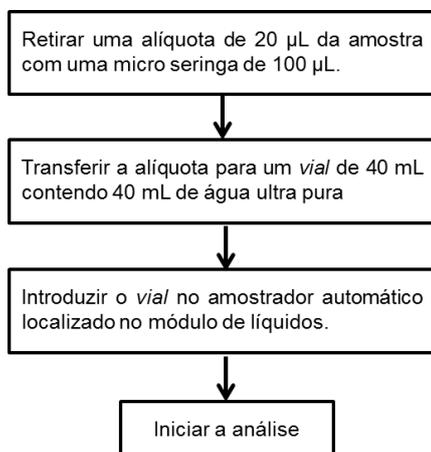


Figura 28: Fluxograma do processo analítico das amostras de metanol e gasolina.

6.5.9. Análise de Gasolina Comum

A amostra de gasolina comum foi analisada através dos dois módulos, a fim de se fazer uma comparação entre os resultados.

Para a análise através do módulo de líquidos do TOC (OI Analytical Aurora 1030W), uma alíquota de 20 μL da amostra é retirada, com o auxílio de uma microseringa de 100 μL , e transferida para uma *vial* contendo 40 mL de água ultra pura. Este *vial* é introduzido no amostrador automático do TOC (OI Analytical modelo 1088). O fluxograma do processo analítico descrito para a realização das análises em amostras de gasolina através do módulo de líquidos se encontra na figura 28.

Já no módulo de sólidos do TOC (OI Analytical Solids modelo 1030), uma alíquota de 20 μL da amostra foi retirada, com o auxílio de uma microseringa de 100 μL , e transferida para um cadinho de quartzo, contendo uma pequena quantidade de lã de vidro. As análises foram realizadas em triplicata. O fluxograma do processo analítico descrito para a realização das análises em amostras de gasolina através do módulo de sólidos se encontra na figura 29.

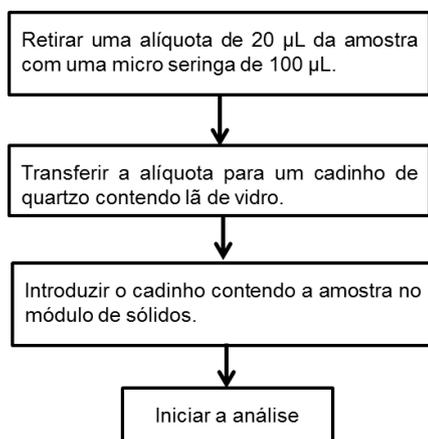


Figura 29: Fluxograma do processo analítico das amostras de gasolina através do módulo de sólidos.

7 Resultados e Discussões

7.1. Planejamento Experimental

A otimização foi realizada com objetivo de maximizar o valor CO₂ gerado, em uma faixa de 2000 – 4000 ppmv. Além disso, objetiva-se também a diminuição nos volumes dos reagentes e do tempo de análise.

O tempo de reação (TR), o volume de persulfato de sódio 5% (VP) e o volume do ácido fosfórico 10% (VA) foram otimizados utilizando um planejamento com metodologia D-Ótimo, que usou pontos de vértice, meio da aresta e centróide. Planejamentos de experimentos tradicionais (planejamentos fatoriais ou fatoriais fracionados, por exemplo) são apropriados para calibrar modelos lineares em situações experimentais onde os fatores são relativamente livres na região de interesse. Inicialmente o planejamento foi feito usando-se os intervalos a seguir para cada variável:

- TR: 2 – 8 minutos
- VP: 2 – 4 mL
- VA: 1 – 2 mL

Sujeitos a seguinte restrição: $0.5 < VP + VA < 10$

A escolha das faixas se deve às recomendações do fabricante do equipamento. Os dados utilizados na otimização se encontram no apêndice.

Através dos resultados obtidos observou-se que quando se trabalha com TR igual a 4 min são obtidos resultados satisfatórios de CO₂ (> 2000 ppmv). Este TR diminui consideravelmente o tempo de trabalho.

Com os resultados obtidos e após breve avaliação, um segundo bloco de resultados foi obtido com os parâmetros abaixo:

- TR: 4 minutos

- VP: 2 – 4 mL
- VA : 1 – 2 mL

O modelo escolhido foi o modelo quadrático, com um R^2 de 90% e obteve-se todos os testes estatísticos adequados. O modelo escolhido foi:

$$CO_2 = + 2132,25 + 80,52 * TR + 170,24 * VP - 114,01 * VA - 2,64 * TR^2 - 6,06 * VP^2 + 167,13 * VA^2 - 3,03 * TR * VP - 15,36 * TR * VA - 85,95 * VP * VA$$

Os valores da função de desejabilidade são mostrados na figura 30, quanto mais próximo a 1 melhor. Já a figura 31 mostra os valores para o CO_2 .

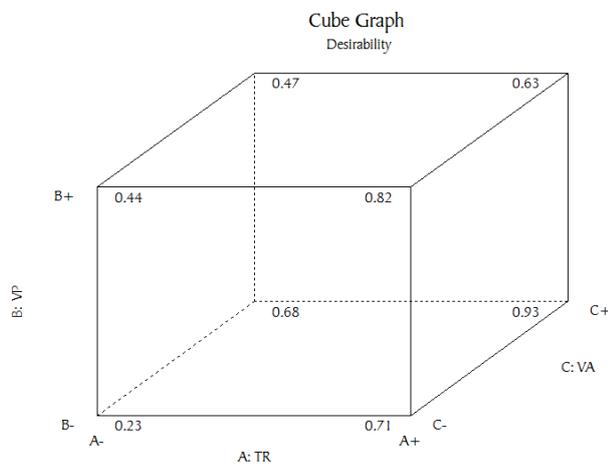


Figura 30: Valores da função de desejabilidade.

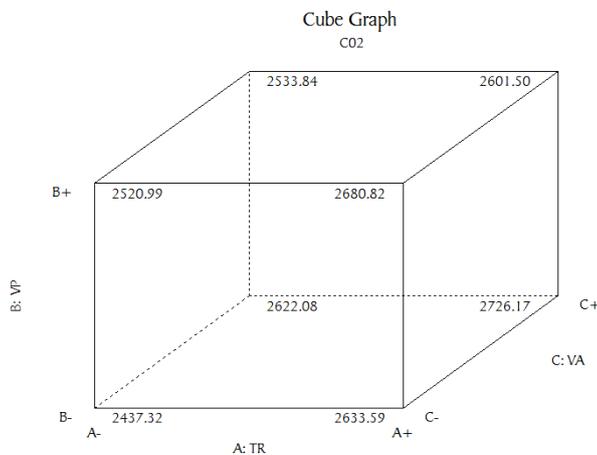


Figura 31: Valores de CO_2 .

As figuras 32 e 33 mostram as superfícies de resposta quando se tem um TR igual a 8 e 4 minutos, respectivamente. Observa-se através destas figuras que os pontos de máximo se encontram quando os valores de VA = 2 mL e VP = 2 mL são utilizados.

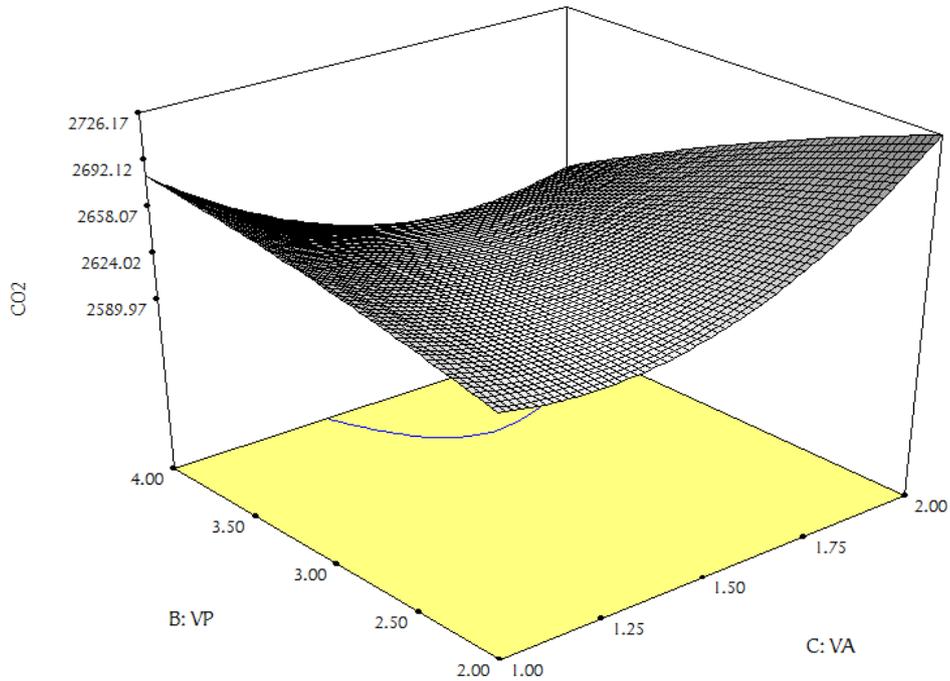


Figura 32: Superfície de resposta com TR = 8 minutos.

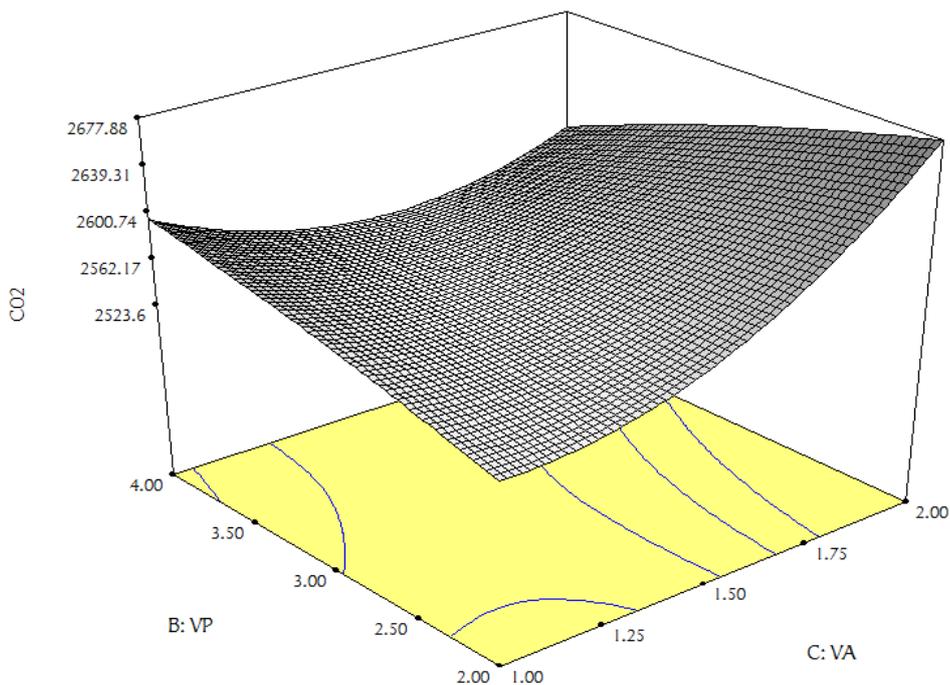


Figura 33: Superfície de resposta com TR = 4 minutos.

Observa-se que apesar de o indicado é usar um TR = 8 min, o ganho de CO₂ não justifica um aumento tão grande no tempo de execução do experimento, por isto refez-se a otimização fixando-se o TR em 4, que parece apresentar um nível de CO₂ em torno de 2600, o que é suficiente. Este valor de CO₂ já é adequado para se obter resultados confiáveis de $\delta(^{13}\text{C})$. Sendo assim, escolheram-se os valores para TR = 4 min., VP = 2 mL e VA = 2 mL como sendo os valores dos parâmetros operacionais de trabalho. A tabela 7 apresenta os valores em triplicata para as condições operacionais escolhidas. A figura 34 apresenta o resultado de CO₂ nas condições operacionais escolhidas.

Tabela 7: Dados obtidos para as condições operacionais do módulo de líquidos do TOC (OI Analytical Aurora modelo 1030W).

Condições Operacionais (TR, VP, VA)	CO ₂ (ppmv)	$\delta(^{13}\text{C})$, ‰
	2614,53	-10,225
4,2,2	2622,37	-10,445
	2620,24	-10,437
média	2619,05	-10,369
desvio padrão	4,05	0,125
CV %	0,16	-1,20

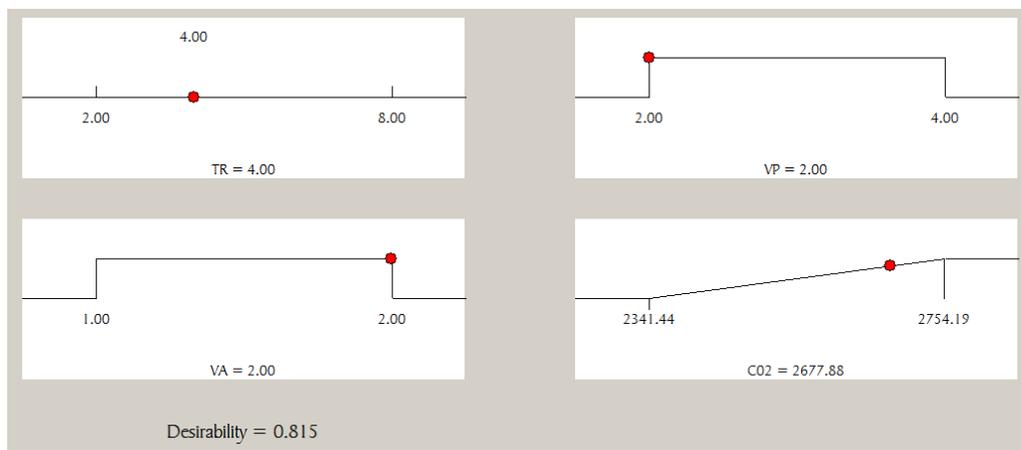


Figura 34: Valor da função de desejabilidade para as condições operacionais escolhidas para o módulo de líquidos do TOC (OI Analytical Aurora modelo 1030W).

7.2. Critérios de Desempenho da Metodologia Analítica

7.2.1. Linearidade

Utilizaram-se duas curvas analíticas que foram realizadas com uma diferença de 6 meses. Isto ocorreu devido a uma manutenção no equipamento ocorrida no mês de março de 2012.

A tabela 8 lista os valores médios de $\delta(^{13}\text{C})$ obtidos dos MRC's utilizados na primeira calibração do CRDS, realizada em setembro de 2011. A figura 35 mostra a primeira curva analítica obtida.

Tabela 8: Dados obtidos para a primeira curva de calibração do CRDS.

Padrões	$\delta(^{13}\text{C})$ esperado, ‰	$\delta(^{13}\text{C})$ obtido, ‰
Ácido L-glutâmico	37,626	36,734
Sacarose	-10,449	-10,154
Cafeína	-27,771	-27,521

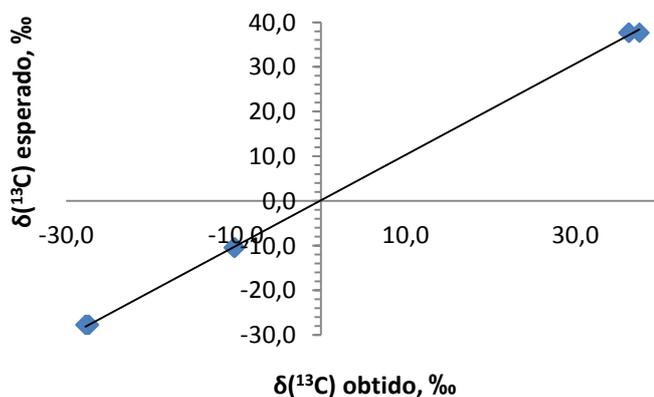


Figura 35: Primeira curva analítica do CRDS.

A equação da reta obtida foi $y = 1,0192x + 0,1216$, com $R^2 = 0,9998$.

O resultado da análise de regressão realizada no programa Microsoft Office Excel 2010 está representado na tabela 10.

Tabela 9: Estatística de regressão

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999898
R-Quadrado	0,999796
R-quadrado ajustado	0,999767
Erro padrão	0,447776
Observações	9

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6886,6214	6886,6214	34346,71	3,5148E-14
Resíduo	7	1,4035	0,2005		
Total	8	6888,0249			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Interseção	0,1216	0,1493	0,815	0,442162	-0,2314	0,4745	-0,2314	0,4745
Inclinação	1,0192	0,005499	185,329	3,515E-14	1,0062	1,0322	1,0062	1,0322

Como o valor de F é um valor elevado, isso mostra que esta regressão é significativa.

Os valores do coeficiente angular e do seu desvio padrão são da mesma ordem de grandeza, isto mostra que a reta passa pela origem, sendo assim, o valor do intercepto pode ser omitido da equação da reta. Para provar isto, fez-se uma nova estatística de regressão, agora omitindo o valor do intercepto (tabela 11).

Tabela 10: Estatística de regressão desconsiderando o valor do intercepto.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99988846
R-Quadrado	0,99977694
R-quadrado ajustado	0,87477694
Erro padrão	0,43825654
Observações	9

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6886,8412	6886,8412	35856,117	3,0237E-14
Resíduo	8	1,5365503	0,1920688		
Total	9	6888,3778			

Tabela 11: Estatística de regressão desconsiderando o valor do intercepto (continuação).

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Inclinação	1,0191	0,005382	189,357	6,77E-16	1,00670	1,0315	1,0067	1,0315

Não houve diferenças significativas nos valores da inclinação e de seu desvio padrão, provando que realmente a reta passa pela origem. Portanto, o desvio padrão associado à regressão possui contribuição somente da inclinação da reta.

A tabela 11 lista os valores médios de $\delta(^{13}\text{C})$ obtidos dos MRC's utilizados na segunda calibração do CRDS, realizada em março de 2012. A figura 36 mostra a nova curva analítica obtida.

Tabela 12: Dados obtidos para segunda curva de calibração do CRDS.

Padrões	$\delta(^{13}\text{C})$ esperado, ‰	$\delta(^{13}\text{C})$ obtido, ‰
Ácido L-glutâmico	37,626	37,731
Sacarose	-10,449	-10,367
Celulose	-24,724	-24,778

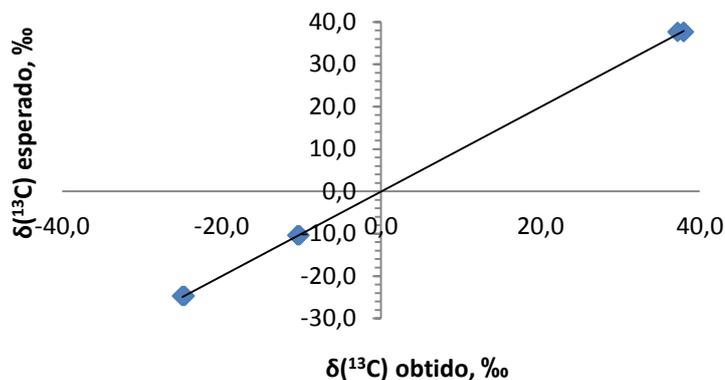


Figura 36: Segunda curva analítica obtida para o CRDS.

A equação da reta obtida foi $y = 0,9979x - 0,0422$, com $R^2 = 0,9999$.

Para a nova curva analítica também foi realizada análise de regressão através do programa Microsoft Office Excel 2010 (tabela 12).

Tabela 13: Estatística de regressão da nova curva analítica

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99996
R-Quadrado	0,99993
R-quadrado ajustado	0,99992
Erro padrão	0,26037
Observações	9

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6402,0292	6402,0292	94432,27	1,02036E-15
Resíduo	7	0,4746	0,0678		
Total	8	6402,5038			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	-0,04220	0,08684	-0,486	0,642	-0,24754	0,16313	0,24754	0,16313
Variável X 1	0,99791	0,00325	307,298	1,0204E-15	0,99023	1,00559	0,99023	1,00559

Nesta análise, o valor de F continua sendo um valor elevado, mostrando que a regressão é significativa.

Nesta análise de regressão, ocorre o mesmo fato que ocorreu na primeira análise de regressão, onde os valores encontrados para o coeficiente angular e para o seu desvio padrão foram da mesma ordem de grandeza. Novamente, para provar que a reta passa pela origem, fez-se uma nova estatística de regressão, agora omitindo o valor do intercepto (tabela 13).

Tabela 14: Estatística de regressão desconsiderando o valor do intercepto da nova curva analítica.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99996
R-Quadrado	0,99992
R-quadrado ajustado	0,87492
Erro padrão	0,24763
Observações	9

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6408,0304	6408,0304	104497,798	7,1583E-16
Resíduo	8	0,4905773	0,0613		
Total	9	6408,521			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Variável X 1	0,99786	0,0030868	323,2612	9,3901E-18	0,9907	1,0050	0,9907	1,0050

Novamente não houve diferenças significativas nos valores da inclinação e de seu desvio padrão, portanto, a reta passa pela origem. Com isso, o desvio padrão associado à regressão possui contribuição somente da inclinação da reta.

7.2.2. Precisão

7.2.2.1. Repetitividade

A tabela 14 mostra os resultados obtidos para a determinação da repetitividade do método. As leituras são referentes à análise de metanol da marca Vetec.

Tabela 15: Resultados para avaliação do parâmetro repetitividade.

Leituras	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$	Leituras	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$
1	-32,076	5	-31,995
2	-32,021	6	-31,962
3	-32,020	7	-31,937
4	-32,011	8	-31,752
média	-31,97		
desvio padrão	0,098		
desvio padrão da média	0,035		

Utilizando os resultados listados pela tabela 14, a repetitividade do método, calculada por meio do desvio padrão, foi de 0,098.

7.2.2.2. Reprodutibilidade

As tabelas 15, 16 e 17 mostram os resultados obtidos para três diferentes amostras, em diferentes dias, para o cálculo da reprodutibilidade do método.

Tabela 16: Resultados obtidos através da análise de açúcar para avaliação do parâmetro reprodutibilidade.

Leituras	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$	Leituras	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$
1	-12,388	10	-12,151
2	-12,359	11	-12,143
3	-12,343	12	-12,134
4	-12,297	13	-12,113
5	-12,294	14	-12,066
6	-12,291	15	-12,062
7	-12,243	16	-12,013
8	-12,241	17	-11,897
9	-12,182	18	-11,761
média	-12,165		
desvio padrão	0,17		
desvio padrão da média	0,039		

Tabela 17: Resultados obtidos através da análise de etanol para avaliação do parâmetro reprodutibilidade.

Leituras	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$	Leituras	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$
1	-12,557	10	-12,242
2	-12,520	11	-12,224
3	-12,404	12	-12,156
4	-12,343	13	-12,141
5	-12,310	14	-12,108
6	-12,290	15	-12,095
7	-12,277	16	-12,088
8	-12,271	17	-12,077
9	-12,256	18	-12,026
média	-12,244		
desvio padrão	0,15		
desvio padrão da média	0,035		

Tabela 18: Resultados obtidos através da análise do metanol da marca Mallinckro para avaliação do parâmetro reprodutibilidade.

Leituras	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$	Leituras	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$
1	-45,0852	10	-44,9283
2	-45,0712	11	-44,9213
3	-45,0564	12	-44,8969
4	-45,0426	13	-44,8353
5	-45,0251	14	-44,8349
6	-44,9794	15	-44,8333
7	-44,9620	16	-44,7661
8	-44,9496	17	-44,6934
9	-44,9495	18	-44,6773
média	-44,917		
desvio padrão	0,12		
desvio padrão da média	0,029		

Para realizar o cálculo da reprodutibilidade fez-se a média simples dos valores dos desvios padrão calculada para cada conjunto de análise. Não se realizou a média ponderada dos resultados, pois em todas as análises o número de leituras foi o mesmo. O valor obtido para a reprodutibilidade foi de 0,15.

Como no cálculo da reprodutibilidade levam-se em conta mais fatores de variabilidade do que na repetitividade, é de se esperar que seu valor seja maior, o que de fato ocorreu ($0,15 > 0,098$).

7.2.3. Exatidão

7.2.3.1. Materiais de Referência Certificados (MRC's)

As médias dos resultados de $\delta(^{13}\text{C})$ obtidos para os MRC's, e também os valores calculados do erro relativo e do índice z (*z-score*) estão listados nas tabelas 18 e 19.

Tabela 19: Resultados obtidos para avaliação do índice z (*z-score*) dos MRC's através do módulo de sólidos do TOC (OI Analytical Solids modelo 1030S).

Padrões	$\delta(^{13}\text{C})_{\text{esperado}}, \text{‰}$	$\delta(^{13}\text{C})_{\text{obtido}}, \text{‰}$	ER	Índice z (<i>z score</i>)
Calcita	-5,764	-5,891	0,116	-1,094
Óleo	-30,031	-30,228	0,108	-1,827

Tabela 20: Resultados obtidos para avaliação do índice z (z-score) dos MRC's através do módulo de líquidos do TOC (OI Analytical Aurora modelo 1030W).

Padrões	$\delta(^{13}\text{C})_{\text{esperado, } \text{‰}}$	$\delta(^{13}\text{C})_{\text{obtido, } \text{‰}}$	ER	Índice z (z score)
Ureia	-8,02	-8,047	0,331	-0,317
Sacarose	-10,449	-10,531	0,787	-0,320

A avaliação feita a partir dos resultados obtidos pelo cálculo do índice z (z-score) é de que todos os resultados são satisfatórios, pois todos os resultados calculados são menores do que o valor de z tabelado ($|z| \leq 2$). Com base nestes resultados, pode-se concluir que ambas as formas de injeção de amostra fornecem resultados de $\delta(^{13}\text{C})$ considerados exatos.

7.2.3.2. Comparação Interlaboratorial

Na tabela 20 encontram-se listados os valores obtidos de $\delta(^{13}\text{C})$ das amostras analisadas tanto por EA-IRMS (LABMAM) e TOC-CRDS (LABAGUAS).

Tabela 21: Resultados obtidos através das duas metodologias diferentes.

Amostra	EA-IRMS		TOC-CRDS		$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}$
	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$	N	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$	N		
Bagaço de cana	-13,590	3	-13,649	3	0,565	2,776
Capim elefante	-12,622	3	-12,572	3	0,269	2,776
Serragem	-26,485	3	-26,526	3	0,375	2,776
Bio-óleo de Serragem	-24,655	3	-24,507	3	1,112	2,776
Lignina	-24,783	2	-25,147	3	2,870	3,182

Através do teste t observa-se que todos os valores de $t_{\text{calculado}}$ são menores do que o $t_{\text{crítico}}$, portanto, pode-se considerar que todos os pares de médias são iguais.

Os resultados obtidos através do índice z para os MRC's analisados através do módulo de sólidos do TOC (OI Analytical Solids modelo 1030) e os resultados obtidos através da comparação interlaboratorial confirmam a exatidão de metodologia para amostras sólidas.

Para comparar os resultados obtidos pelo LABMAM, LABAGUAS e PICARRO, fez-se uma análise de variância, que se encontra na tabela 21. A memória de cálculo para as amostras se encontram no apêndice.

Tabela 22: Resultados obtidos através de três laboratórios diferentes.

Amostra	LABMAM	LABAGUAS	PICARRO	F _{calculado}	F _{crítico}	DMS
	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$			
Bagaço de cana	-13,590	-13,649	-13,042	17,281	5,786	0,286
Capim elefante	-12,622	-12,572	-12,300	2,644	5,143	
Serragem	-26,485	-26,526	-26,273	4,104	5,143	
Bio-óleo de Serragem	-24,655	-24,507	-24,506	0,842	4,256	
Lignina	-24,783	-25,147	-24,569	11,840	5,786	0,347

Através dos resultados obtidos, observa-se que o F calculado para as amostras bagaço de cana e lignina foram maiores que o valor crítico de F em um nível de confiança de 95%. A heterogeneidade das amostras de lignina e bagaço de cana pode ter influenciado nos resultados obtidos. Sendo assim, conclui-se que há uma diferença significativa entre os resultados obtidos pelos três laboratórios para essas duas amostras. Para as demais amostras isso não ocorre.

Foram calculadas as diferenças menos significativas dos resultados obtidos para as amostras bagaço de cana e lignina (apêndice). Através dos resultados observa-se que o resultado obtido pela PICARRO difere dos obtidos pelo LABMAM e pelo LABAGUAS para a amostra de bagaço de cana, e que não há diferença entre os resultados obtidos pelo LABMAM e pelo LABAGUAS. Já para a amostra de lignina, o resultado obtido pelo LABAGUAS difere dos obtidos pelo LABMAM e pela PICARRO, já os resultados obtidos pelo LABMAM e pela PICARRO não diferem entre si. Apesar dos resultados obtidos pelo LABAGUAS e pelo LABMAM apresentarem uma diferença significativa, esta diferença não foi tão grande (0,364).

7.2.4. Incertezas de Medições

Os cálculos da incerteza de medição combinada e expandida, para as amostras de açúcar, etanol, metanol e gasolina utilizaram os dados da primeira curva de calibração. A memória de cálculo para estas amostras se encontra na tabela 22.

Tabela 23: Memória de cálculo das incertezas de medição das amostras de açúcar, etanol, metanol e gasolina.

Dados	
m	1,02
s _m	0,0054
Reprodutibilidade	0,15

Açúcar		Etanol	
\bar{x}	-12,165	\bar{x}	-12,244
s _x	0,165	s _x	0,149
n	18	n	18
u _c	0,080	u _c	0,072
u _x	0,166	u _x	0,163
v _{ef}	16	v _{ef}	22
U	0,35	U	0,34

Gasolina		Metanol Vetec	
\bar{x}	-23,305	\bar{x}	-31,972
s _x	0,153	s _x	0,0982
n	3	n	8
u _c	0,117	u _c	0,056
u _x	0,187	u _x	0,156
v _{ef}	4	v _{ef}	41
U	0,52	U	0,32

Metanol Mallinckro		Metanol Fluka	
\bar{x}	-44,917	\bar{x}	-41,52
s _x	0,123	s _x	0,15
n	18	n	3
u _c	0,057	u _c	0,113
u _x	0,156	u _x	0,185
v _{ef}	40	v _{ef}	4
U	0,32	U	0,51

Tabela 24: Memória de cálculo das incertezas de medição das amostras de açúcar, etanol, metanol e gasolina (continuação).

Metanol Merk		Metanol MTEDIA	
\bar{x}	-32,116	\bar{x}	-38,148
s_x	0,079	s_x	0,091
n	3	n	3
u_c	0,058	u_c	0,067
u_x	0,157	u_x	0,160
v_{ef}	29	v_{ef}	18
U	0,32	U	0,34

onde:

- m = Inclinação da linha
- s_m = Desvio padrão de m
- \bar{x} = Valor médio de $\delta(^{13}\text{C})$ obtidos, ‰
- s_x = Desvio padrão de x
- n = Número de replicatas
- u_c = Incerteza da curva de calibração
- u_x = Incerteza dos valores obtidos
- v_{ef} = Número de graus de liberdade efetivo
- U = Incerteza expandida

Os cálculos das incertezas de medição combinada e expandida, para as amostras de biomassas e do bio-óleo de serragem utilizaram os dados da segunda curva de calibração. A memória de cálculo para estas amostras se encontra na tabela 23.

Tabela 25: Memória de cálculo das incertezas de medição das amostras de biomassa e bio-óleo de serragem.

Dados	
m	0,998
S _m	0,0031
Reprodutibilidade	0,15

Bagaço de Cana		Capim elefante	
\bar{x}	-13,649	\bar{x}	-12,572
S _x	0,148	S _x	0,283
n	3	n	3
u _c	0,112	u _c	0,215
u _x	0,184	u _x	0,260
v _{ef}	4	v _{ef}	3
U	0,51	U	0,83

Serragem		Bio-óleo de Serragem	
\bar{x}	-26,526	\bar{x}	-24,507
S _x	0,114	S _x	0,1461
n	3	n	3
u _c	0,086	u _c	0,111
u _x	0,169	u _x	0,183
v _{ef}	8	v _{ef}	4
U	0,39	U	0,51

Lignina	
\bar{x}	-25,147
S _x	0,218
n	3
u _c	0,165
u _x	0,220
v _{ef}	2
U	0,95

7.3. Análise de Amostras Reais

7.3.1. Biomassas e Bio-óleo

Os valores encontrados para as amostras de biomassa, juntamente com suas incertezas expandidas se encontram listados na tabela 24.

Tabela 26: Resultados obtidos para as amostras de biomassa analisadas.

Amostra	$\delta(^{13}\text{C}), \text{‰}$	
Bagaço de cana	-13,65	$\pm 0,51$
Capim elefante	-12,57	$\pm 0,83$
Serragem	-26,53	$\pm 0,39$
Lignina	-25,15	$\pm 0,95$

As amostras de bagaço de cana e de capim elefante possuem a assinatura isotópica característica de plantas do tipo C4, estando os valores de $\delta(^{13}\text{C})$ encontrados compreendidos no intervalo de -17 a -9 ‰ (Farquhar *et al.*, 1989; Martinelli *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2002; Padovan *et al.*, 2003; Pupin *et al.*, 1998; Rossi, N. F. *et al.*, 1999; Silva, B. M. *et al.*, 1999; Sleiman *et al.*, 2008).

Já as amostras de serragem e de lignina possuem a assinatura isotópica característica de plantas do tipo C3, estando os valores de $\delta(^{13}\text{C})$ encontrados compreendidos no intervalo de -32 a -22 ‰ (Farquhar *et al.*, 1982; Martinelli *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2002).

O bio-óleo de serragem apresentou um valor de $-24,51 \pm 0,51 \text{‰}$, que é um valor próximo à da sua biomassa correspondente, $-26,53 \pm 0,39 \text{‰}$.

7.3.2. Biocombustível

O valor encontrado para o etanol, $-12,24 \pm 0,34 \text{‰}$, está de acordo com Pissinatto *et al.* (1999), $-12,9 \text{‰}$, que estudou a razão isotópica do etanol em *brandies* brasileiros, sendo este o valor encontrado para um *brandie* cujo etanol foi produzido exclusivamente da cana-de-açúcar. Isto prova que os biocombustíveis possuem a assinatura isotópica próxima da sua biomassa de origem.

7.3.3. Açúcar

O valor encontrado para o $\delta(^{13}\text{C})$ da amostra de açúcar da marca União foi de $-12,16 \pm 0,35 \text{ ‰}$. Este valor está de acordo com Nogueira *et al.* (2011) e Queiroz *et al.* (2009), sendo que o valor do $\delta(^{13}\text{C})$ encontrado por eles fornecia um valor médio de $-12,83 \text{ ‰}$ e $-12,48 \text{ ‰}$, respectivamente.

Os valores do $\delta(^{13}\text{C})$ da amostra de açúcar e de etanol combustível são muito próximos, reafirmando o que era esperado, pois ambos possuem a mesma origem, sendo obtidos através da cana-de-açúcar.

7.3.4. Metanol

Os valores encontrados para as amostras de metanol, juntamente com suas incertezas expandidas se encontram listados na tabela 25.

Tabela 27: Resultados obtidos para as amostras de metanol analisadas.

Marca	$\delta(^{13}\text{C}), \text{ ‰}$	
Fluka	-41,52	$\pm 0,51$
Mallinckro	-44,92	$\pm 0,32$
Merk	-32,12	$\pm 0,32$
MTEDIA	-38,15	$\pm 0,34$
Vetec	-31,97	$\pm 0,32$

Não se sabe a origem das amostras de metanol aqui estudadas. Avaliando as assinaturas isotópicas obtidas, é provável que a origem dessas amostras seja petrogênica.

7.3.5. Gasolina Comum

Foi obtido um valor médio de $-23,31 \pm 0,52 \text{ ‰}$ para a amostra de gasolina comum através do módulo de sólidos do TOC (OI Analytical Solids modelo 1030). O valor encontrado condiz com a faixa de $\delta(^{13}\text{C})$ característico de produtos de origem petrogênica (-21 a -35 ‰) relatado por diversos autores (Fixari *et al.*, 1994; Hough *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Louie *et al.*, 1993; Mazeas e Budzinski, 2001; Meier-Augenstein, 1999; Rogers e Savard, 1999; Sun *et al.*,

2003). Esta faixa pode ser observada através da figura 4. Já o valor médio obtido através do módulo de líquidos (OI Analytical Aurora 1030W), foi de - 12,59 ‰.

Os valores obtidos foram bastante discrepantes entre si. A análise da gasolina através do módulo de líquidos (OI Analytical Aurora 1030W) mostrou que apenas as reações com persulfato de sódio 5% e com ácido fosfórico 10% a 100 °C não se mostraram eficazes para a oxidação completa das amostras de gasolina. Outro problema encontrado foi que a gasolina em água acaba ficando retida na parede do *vial*. Já o método de análise a partir do módulo de sólidos do TOC (OI Analytical Solids modelo 1030), pela queima da amostra a 900 °C se mostrou mais eficiente para analisar amostras de gasolina, já que estas possuem uma estrutura complexa.

O valor de -23,31 ‰, mais próximo ao valor superior da faixa esperada, reflete a presença de etanol. Já o valor de -12,59 ‰ encontra-se próximo daquele do etanol, molécula mais simples oxidada mais rapidamente do que os hidrocarbonetos da gasolina.

Como a gasolina é uma mistura de diferentes petróleos, sua assinatura vai depender da região de cada refinaria.

Objetivava-se analisar uma amostra pura de gasolina, para saber exatamente a proporção da mistura com o etanol, mas isto não foi possível.

Se a gasolina estivesse adulterada com metanol, esta adulteração seria facilmente observada, já que as assinaturas isotópicas do etanol e do metanol são bem distintas.

8 Conclusões

Neste trabalho, foram desenvolvidos e implantados dois métodos de análise isotópica empregando-se um analisador a laser. Um deles para análise de amostras sólidas e outro para análise de amostras líquidas através de um espectrômetro de cavidade ressonante do tipo *ring-down*. Esta é uma técnica nova, rápida e simples, pois as amostras não precisam de tratamento prévio, todo o tratamento necessário é realizado *on-line*, diminuindo com isso os erros associados e os resíduos.

A exatidão dos dois métodos desenvolvidos foi avaliada através da análise de materiais de referência certificados (MRC) e de ensaios interlaboratoriais. Os resultados obtidos foram avaliados através da aplicação do índice z (*z-score*) e os valores de z calculados demonstraram a exatidão dos dois métodos propostos.

Os resultados obtidos através do método para análise de amostras sólidas foi comparado com sucesso com os obtidos através de um espectrômetro de massas de razões isotópicas (EMRI).

A metodologia para análise de biomassa e biocombustíveis se mostrou bastante eficiente. Isto é um ótimo resultado devido ao grande investimento no estudo dos biocombustíveis no Brasil, a fim de buscar novas fontes alternativas de energia e também possibilita a criação de um banco de dados com informações a respeito de diferentes biocombustíveis relacionado às suas biomassas de origem.

O módulo de líquidos do analisador de carbono orgânico total acoplado ao CRDS se mostrou uma ferramenta eficaz na análise de amostras voláteis, como o metanol e o etanol, em vista que amostras desse tipo são difíceis de serem analisadas, pois normalmente elas evaporam antes de se concluir a análise. Entretanto, para a análise de amostras de gasolina foi necessário o emprego do

módulo de sólidos uma vez que o emprego do módulo para líquidos não se mostrou adequado para este tipo de amostra.

Seguem sugestões para trabalhos futuros: analisar novas amostras sólidas e líquidas, a fim de realizar novos estudos, tais como detecção de adulteração em alimentos e bebidas, determinação da origem, análise de bioplásticos, entre outros. Com relação à biomassa e biocombustíveis, sugere-se que sejam analisadas novas amostras e que outras assinaturas isotópicas sejam determinadas, além da assinatura isotópica de carbono, para com isso aumentar a quantidade de informações a respeito dessas amostras a fim de se criar um banco de dados.

Referências Bibliográficas

AL-AROURI, K. R.; MCKIRDY, D. M.; BOREHAM, C. J. Oil-source correlations as a tool in identifying the petroleum systems of the southern Taroom Trough, Australia. **Organic Geochemistry**, v. 29, n. 1–3, p. 713-734, 1998.

ANGEROSA, F. *et al.* Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1013-1017, 1999.

ANGEROSA, F. *et al.* Carbon stable isotopes and olive oil adulteration with pomace oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3044-3048, 1997.

ANP. Agência nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br> >. Acesso em: 28 de novembro 2011.

ARAKAKI, A. H. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa rica em cobre e zinco por fermentação submersa utilizando leveduras isoladas do Baru (*Dipteryx alata* Vog.) e testados em resíduos da agroindústria brasileira**. 2010. 155 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos: Agroindústria e biocombustíveis). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ARAUCO, E. M. R. *et al.* Variabilidade isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em méis brasileiros utilizando sua proteína como padrão interno. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 4, p. 299-304, 2008a.

ARAUCO, E. M. R. *et al.* Variabilidade isotópica do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) e do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em proteína de méis brasileiros. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 3, p. 190-193, 2008b.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3a. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006, 968 p.

ATKINSON, D. B. Solving chemical problems of environmental importance using cavity ring-down spectroscopy. **Analyst**, v. 128, n. 2, p. 117-125, 2003.

BALLENTINE, D. C.; MACKO, S. A.; TUREKIAN, V. C. Variability of stable carbon isotopic compositions in individual fatty acids from combustion of C4 and C3 plants: implications for biomass burning. **Chemical Geology**, v. 152, n. 1–2, p. 151-161, 1998.

BASKARAN, M. **Handbook of environmental isotope geochemistry**. Advances in isotope geochemistry. 1a. ed. ed. New York: Springer, 2011, 951 p.

BENSON, S. *et al.* Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry - A review. **Forensic Science International**, v. 157, n. 1, p. 1-22, 2006.

BERDEN, G. *et al.* **Cavity ring-down spectroscopy: techniques and application**. 1st. ed. Great Britain: John Wiley & Sons, Ltd, 2009, 344 p.

BERDEN, G.; PEETERS, R.; MEIJER, G. Cavity ring-down spectroscopy: experimental schemes and applications. **International Reviews in Physical Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 565-607, 2000.

BERRYMAN, E. M. *et al.* Adaptation of continuous-flow cavity ring-down spectroscopy for batch analysis of $\delta^{13}\text{C}$ of CO_2 and comparison with isotope ratio mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 16, p. 2355-2360, 2011.

BHAT, M. I.; FAISUL UR, R.; BHAT, M. A. Applications of stable and radioactive isotopes in soil science. **Current Science**, v. 98, n. 11, p. 1458-1471, 2010.

BRAND, W. A. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, n. 3, p. 225-235, 1996.

BRANDES, J. A. Rapid and precise $\delta^{13}\text{C}$ measurement of dissolved inorganic carbon in natural waters using liquid chromatography coupled to an isotope-ratio mass spectrometer. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 7, p. 730-739, 2009.

BROOKS, J. R. *et al.* Heavy and light beer: A carbon isotope approach to detect C-4 carbon in beers of different origins, styles, and prices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6413-6418, 2002.

BROWN, S. S. Absorption spectroscopy in high-finesse cavities for atmospheric studies. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 12, p. 5219-5238, 2003.

CARRETE JR., H. *et al.* Tomografia computadorizada na intoxicação por metanol. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 51, n. 1, p. 93-95, 1994.

CHEN, H. *et al.* High-accuracy continuous airborne measurements of greenhouse gases CO_2 and CH_4 using the cavity ring-down spectroscopy (CRDS) technique. **Atmospheric Measurement Techniques**, v. 3, n. 2, p. 375-386, 2010.

CRAGO, C. L. *et al.* Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compared to US corn ethanol. **Energy Policy**, v. 38, n. 11, p. 7404-7415, 2010.

CROSSON, E. R. WS-CRDS: Precision Trace Gas Analysis and Simplified Stable Isotope Measurements. **American Laboratory**, v. 40, n. 20, p. 37-+, 2008.

CROSSON, E. R. *et al.* Pulse-stacked cavity ring-down spectroscopy. **Review of Scientific Instruments**, v. 70, n. 1, p. 4-10, 1999.

CROSSON, E. R. *et al.* Stable isotope ratios using cavity ring-down spectroscopy: Determination of C-13/C-12 for carbon dioxide in human breath. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 9, p. 2003-2007, 2002.

CRUNAIRE, S. *et al.* Use of cw-CRDS for studying the atmospheric oxidation of acetic acid in a simulation chamber. **Applied Physics B-Lasers and Optics**, v. 85, n. 2-3, p. 467-476, 2006.

DI PAOLA-NARANJO, R. D. *et al.* Fingerprints for Main Varieties of Argentinean Wines: Terroir Differentiation by Inorganic, Organic, and Stable Isotopic Analyses Coupled to Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7854-7865, 2011.

DIAS, M. O. S. *et al.* Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, n. 9, p. 1206-1216, 2009.

DUPIN, E. E. V. *et al.* Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais (DEMEC UFMG). Disponível em: <<http://www.demec.ufmg.br/disciplinas/ema003/liquidos/gasolina/gasolina.htm>>. Acesso em: 02 de janeiro 2012.

Embrapa Milho e Sorgo. **Notícias Agrícolas**. Disponível em: <<http://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/sucroenergetico/105842-etanol-de-segunda-geracao-nova-possibilidade-de-combustivel-renovavel.html>>. Acesso em: 20 de maio de 2012

EURACHEM. *Determinando a incerteza na medição analítica*. 2a. ed., 2002.

FARQUHAR, G. D. On the nature of carbon isotope discrimination in c-4 species. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 10, n. 2, p. 205-226, 1983.

FARQUHAR, G. D.; EHLERINGER, J. R.; HUBICK, K. T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 503-537, 1989.

FARQUHAR, G. D.; OLEARY, M. H.; BERRY, J. A. On the relationship between carbon isotope discrimination and the inter-cellular carbon-dioxide concentration in leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 9, n. 2, p. 121-137, 1982.

FERNANDES, C. D. S. **Análise estatística das emissões de CO e HC produzidas por gases da exaustão veicular oriundos de gasolina, GNV e mistura álcool gasolina**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado). Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

FERREIRA, A. A.; ABREU, M. Q.; FERREIRA, M. A. Os perigos do metanol (Álcool de madeira). **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 6, p. 214-216, 1981.

FIGUEIRA, R. *et al.* Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em néctares de uva. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n. 2, p. 233-246, 2010.

FIGUEIRA, R. *et al.* Método de análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e quantificação da percentagem de fonte C_3 em sucos de uva comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 147-155, 2010.

FIGUEIRA, R. *et al.* Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de caju. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 4, p. 317-324, 2011.

FIGUEIRA, R. *et al.* Método de análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e limite de legalidade em néctar de laranja. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 211-219, 2011.

FIXARI, B. *et al.* Stable carbon-isotope analysis of heavy oils. **Fuel**, v. 73, n. 3, p. 375-380, 1994.

FREITAS, R. C. D. **Etanol X metanol, disputa inflamável.** Revista biosieselbr, 3a. ed., 2008. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/revista/promo/destaques-03.htm>>. Acesso em: 28 de novembro 2011.

GHIDINI, S. *et al.* Stable isotopes determination in food authentication: a review. **Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma**, v. XXVI, p. 193-204, 2006.

GIEBEL, B. M.; SWART, P. K.; RIEMER, D. D. New Insights to the Use of Ethanol in Automotive Fuels: A Stable Isotopic Tracer for Fossil- and Bio-Fuel Combustion Inputs to the Atmosphere. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 15, p. 6661-6669, 2011.

GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental Research Letters**, v. 1, n. 1, 2006.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, n. 6, p. 2086-2097, 2008.

GRASSINEAU, N. V. High-precision EA-IRMS analysis of S and C isotopes in geological materials. **Applied Geochemistry**, v. 21, n. 5, p. 756-765, 2006.

HAIR, J. F. J. *et al.* **Análise multivariada de dados**. 6a. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 688 p.

HEDGES, R. E. M.; STEVENS, R. E.; RICHARDS, M. P. Bone as a stable isotope archive for local climatic information. **Quaternary Science Reviews**, v. 23, n. 7-8, p. 959-965, 2004.

HOUGH, R. L. *et al.* Identifying source correlation parameters for hydrocarbon wastes using compound-specific isotope analysis. **Environmental Pollution**, v. 143, n. 3, p. 489-498, 2006.

INMETRO DOQ-CGCRE-008, julho 2011 - *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*.

JASPER, J. P. *et al.* Stable isotopic characterization of active pharmaceutical ingredients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 1, p. 21-30, 2004.

KATO, S. *et al.* Stable isotopic compositions of carbon monoxide from biomass burning experiments. **Atmospheric Environment**, v. 33, n. 27, p. 4357-4362, 1999.

KELLY, S. D.; RHODES, C. Emerging techniques in vegetable oil analysis using stable isotope ratio mass spectrometry. **Grasas Y Aceites**, v. 53, n. 1, p. 34-44, 2002.

KERSTEL, E. R. T. *et al.* Simultaneous determination of the $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope abundance ratios in water by means of laser spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 23, p. 5297-5303, 1999.

LEHMANN, K. K.; ROMANINI, D. The superposition principle and cavity ring-down spectroscopy. **Journal of Chemical Physics**, v. 105, n. 23, p. 10263-10277, 1996.

LI, Y. *et al.* Compound-specific stable carbon isotopic composition of petroleum hydrocarbons as a tool for tracing the source of oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 114-117, 2009.

LOUIE, P. K. K. *et al.* A comparison by stable isotope mass spectrometry of coal-oil coprocessing under severe-hydropyrolysis and thermal conditions. **Fuel**, v. 72, n. 11, p. 1507-1513, 1993.

MARTIN, S. Recent advances in petroleum isotope geochemistry. **Organic Geochemistry**, v. 6, n. 0, p. 645-663, 1984.

MARTINELLI, L. A. *et al.* Stable carbon isotope variation in C3 and C4 plants along the Amazon River. **Nature**, v. 353, n. 6339, p. 57-59, 1991.

MARTINELLI, L. A. *et al.* **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. 1a. ed. ed. São Paulo: Oficina de Textos 2009, 144 p.

MAZEAS, L.; BUDZINSKI, H. Polycyclic aromatic hydrocarbon $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio measurement in petroleum and marine sediments - Application to standard reference materials and a sediment suspected of contamination from the Erika oil spill. **Journal of Chromatography A**, v. 923, n. 1-2, p. 165-176, 2001.

MEIER-AUGENSTEIN, W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 842, n. 1-2, p. 351-371, 1999.

MENDES, F. E. **Avaliação de programas de controle de poluição atmosférica por veículos leves no Brasil**. 2004. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências em Planejamento Energético). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro.

NAKASHITA, R. *et al.* Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, n. 1-2, p. 148-152, 2008.

NOGUEIRA, A. M. P. *et al.* Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) para detecção de adulteração em néctares de pêssego. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 115-124, 2011.

NOVÁK, M. *et al.* Similarity between C, N and S stable isotope profiles in European spruce forest soils: implications for the use of $\delta^{34}\text{S}$ as a tracer. **Applied Geochemistry**, v. 18, n. 5, p. 765-779, 2003.

O'KEEFE, A. Integrated cavity output analysis of ultra-weak absorption. **Chemical Physics Letters**, v. 293, n. 5-6, p. 331-336, 1998.

O'KEEFE, A.; DEACON, D. A. G. Cavity ring-down optical spectrometer for absorption-measurements using pulsed laser sources. **Review of Scientific Instruments**, v. 59, n. 12, p. 2544-2551, 1988.

O'LEARY, M. H. Carbon Isotopes in Photosynthesis. **Bioscience**, v. 38, n. 5, p. 328-336, 1988.

OI ANALYTICAL. Stable carbon isotope fingerprinting of raw and weathered petroleum using an isotopic total organic carbon analyzer. **Application Note #36680211**. Disponível em: < <http://www.oico.com/default.aspx?id=searchresults> >. Acesso em: 17 de janeiro 2012.

OLIVEIRA, A. C. B. *et al.* Isótopos estáveis e produção de bebidas: de onde vem o carbono que consumimos? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 258-288, 2002.

PADOVAN, G. J. *et al.* Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. **Food Chemistry**, v. 82, n. 4, p. 633-636, 2003.

PALDUS, B. A.; KACHANOV, A. A. An historical overview of cavity-enhanced methods. **Canadian Journal of Physics**, v. 83, n. 10, p. 975-999, 2005.

PARK, R.; EPSTEIN, S. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. **Geochimica Et Cosmochimica Acta**, v. 21, n. 1-2, p. 110-126, 1960.

PAUL, J. B.; LAPSON, L.; ANDERSON, J. G. Ultrasensitive absorption spectroscopy with a high-finesse optical cavity and off-axis alignment. **Applied Optics**, v. 40, n. 27, p. 4904-4910, 2001.

PAUL, J. B.; SAYKALLY, R. J. Cavity ring down laser absorption spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 9, p. 287A-292A, 1997.

PEREIRA, A. L.; BENEDITO, E. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 13, n. 1-2, p. 16-27, 2007.

PÉREZ, E. P. **Substituição do diesel usado nos queimadores industriais por álcool combustível**. 2007. 207 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica na área de Transmissão e Conversão de Energia). Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá.

PETERSON, B. J.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 293-320, 1987.

PETROBRÁS. Disponível em: < <http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/fontes-de-energia/biocombustiveis/> >. Acesso em: 15 de março 2012.

PICARRO. Automated measurement of $\delta^{13}\text{C}$ for identifying and classifying edible oils. **Application Note #018**. Disponível em: < http://www.picarro.com/application_notes/an_18_automated_measurement_of_13c_for_identifying_edible_oils >. Acesso em: 5 de maio 2011.

PICARRO. Combustion module-CRDS for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of imported honey and detection adulteration. **Application Note #022**. Disponível em: <http://www.picarro.com/application_notes/an_22_combustion_module_crds_for_13c_analysis_of_imported_honey_and_detection_of_adulteratio>. Acesso em: 5 de maio 2011.

PICARRO. Picarro's combustion module-CRDS provides excellent data using the approved AOAC internal standard isotope ratio analysis (ISCIRA) method for honey (AOAC 998.12). **Application Note #023**. Disponível em: <http://www.picarro.com/application_notes/an_23_picarro_cm_crds_using_the_approved_aoac_internal_standard_isotope_ratio_analysis_iscir>. Acesso em: 3 de maio 2011.

PISSINATTO, L. *et al.* Stable carbon isotopic analysis and the botanical origin of ethanol in brazilian brandies. **Food Research International**, v. 32, n. 10, p. 665-668, 1999.

PUERTO RICO, J. A.; MERCEDES, S. S. P.; SAUER, I. L. Genesis and consolidation of the Brazilian bioethanol: A review of policies and incentive mechanisms. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 7, p. 1874-1887, 2010.

PUPIN, A. M. *et al.* Use of isotopic analyses to determine the authenticity of brazilian orange juice (*Citrus sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1369-1373, 1998.

QUEIROZ, E. C. *et al.* Determinação da razão isotópica $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas comerciais a base de laranja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 1085-1094, 2009.

QUEIROZ, E. C. *et al.* Quantificação de açúcar de cana em suco de laranja através de análise isotópica do carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 4, p. 278-284, 2007.

REPORT, R. G. S. Renewable Energy Policy Network for the 21st Century (REN21). Disponível em: <http://www.ren21.net/Portals/97/documents/GSR/REN21_GSR2011.pdf>. Acesso em: 26 de dezembro 2011.

ROBOZ, J. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation and techniques**. 1st. ed. New York: Interscience, 1968, 539 p.

ROGERS, K. M.; SAVARD, M. M. Detection of petroleum contamination in river sediments from Quebec City region using GC-IRMS. **Organic Geochemistry**, v. 30, n. 12, p. 1559-1569, 1999.

ROMANINI, D. *et al.* CW cavity ring down spectroscopy. **Chemical Physics Letters**, v. 264, n. 3-4, p. 316-322, 1997.

ROMANINI, D.; KACHANOV, A. A.; STOECKEL, F. Diode laser cavity ring down spectroscopy. **Chemical Physics Letters**, v. 270, n. 5-6, p. 538-545, 1997.

ROSSI, L.; COSTANTINI, M. L.; BRILLI, M. Does stable isotope analysis separate transgenic and traditional corn (*Zea mays* L.) detritus and their consumers? **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 2, p. 449-453, 2007.

ROSSI, N. F. *et al.* Análise da adulteração de méis por açúcares comerciais utilizando-se a composição isotópica de carbono. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 199-204, 1999.

ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**, v. 17, n. 3, p. 347-381, 2001.

SECRETARIA DA SAÚDE. Disponível em: < http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/Intoxicacoes_por_Produtos_Quimicos_Derivados_do_Petroleo.pdf >. Acesso em: 03 de dezembro 2011.

SILVA, A. T. B. D. **Cenários do futuro e capacidades dinâmica: um estudo no setor de etanol**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Administração). Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

SILVA, B. M. *et al.* Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: uma revisão adulteration of fruit juice by addition of sugars: a review adulteración por adición de azúcares a zumos de frutas: una revisión. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, v. 2, n. 4, p. 184-191, 1999.

SILVEIRA, C. S.; JÚNIOR, G. C. D. S. **O uso de isótopos ambientais em estudos hidrogeológicos no Brasil: uma resenha crítica**. Anuário do Instituto de Geociências. CARVALHO, I. D. S. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), v. 25, p. 25-43, 2002.

SILVEIRA, J. L. *et al.* The benefits of ethanol use for hydrogen production in urban transportation. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2525-2534, 2009.

SIMPKINS, W. A. *et al.* Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. **Food Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 385-390, 2000.

SLEIMAN, M. *et al.* Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 95-102, 2008.

SLEIMAN, M. *et al.* Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 163-172, 2010.

SMALLWOOD, B. J.; PAUL PHILIP, R.; ALLEN, J. D. Stable carbon isotopic composition of gasolines determined by isotope ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry. **Organic Geochemistry**, v. 33, n. 2, p. 149-159, 2002.

SMEETS, E. *et al.* The sustainability of Brazilian ethanol - An assessment of the possibilities of certified production. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, n. 8, p. 781-813, 2008.

SOUZA-KRULISKI, C. R. D. *et al.* Estudo de adulteração em méis brasileiros através de razão isotópica do carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 434-439, 2010.

SPENCE, T. G. *et al.* A laser-locked cavity ring-down spectrometer employing an analog detection scheme. **Review of Scientific Instruments**, v. 71, n. 2, p. 347-353, 2000.

SUN, C. G. *et al.* Resolving coal and petroleum-derived polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in some contaminated land samples using compound-specific stable carbon isotope ratio measurements in conjunction with molecular fingerprints. **Fuel**, v. 82, n. 15-17, p. 2017-2023, 2003.

SUZUKI, Y. *et al.* A Novel Method to Discriminate between Plant- and Petroleum-derived Plastics by Stable Carbon Isotope Analysis. **Chemistry Letters**, v. 39, n. 9, p. 998-999, 2010.

SUZUKI, Y. *et al.* Geographical origin of polished rice based on multiple element and stable isotope analyses. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 470-475, 2008.

TAUHATA, L. *et al.* **Radioproteção e dosimetria: fundamentos**. 5ª ed. ed. Rio de Janeiro: Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD) / Comissão Nacional De Energia Nuclear (CNEN), 2003, 254 p.

TOLEDO, K. **FAPESP**. Disponível em: < <http://agencia.fapesp.br/15120> >. Acesso em: 20 de maio de 2012

TOMITA, H. *et al.* Rapid-swept CW cavity ring-down laser spectroscopy for carbon isotope analysis. **Journal of Nuclear Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 311-315, 2006.

TRIVELIN, P. C. O. 253, 2009 - *Fracionamento dos isótopos estáveis de carbono na fixação do CO₂ atmosférico por plantas C₃, C₄ e CAM: Aplicações*.

VOIGT, C. L. **Síntese e caracterização espectroscópica de biocombustível de óleo de fritura**. 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos - Área de Avaliação Tecnológica de Matérias-Primas). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

WAHL, E. H. *et al.* Applications of cavity ring-down spectroscopy to high precision isotope ratio measurement of C-13/C-12 in carbon dioxide. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 42, n. 1, p. 21-35, 2006.

WATSON, J. T. **Introduction to mass spectrometry**. 3rd. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, 496 p.

WERNER, R. A.; BRAND, W. A. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 7, p. 501-519, 2001.

ZALICKI, P.; ZARE, R. N. Cavity ring-down spectroscopy for quantitative absorption-measurements. **Journal of Chemical Physics**, v. 102, n. 7, p. 2708-2717, 1995.

ZARE, R. N. *et al.* High-precision optical measurements of $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ isotope ratios in organic compounds at natural abundance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 27, p. 10928-10932, 2009.

10 Apêndice

10.1. Dados Utilizados no Planejamento Experimental.

Bloco	TR	VP	VA	CO ₂
Block 1	5	4	1,5	2488,731
Block 1	5	3	1,5	2502,102
Block 1	2	4	1	2405,439
Block 1	8	3	1,5	2509,941
Block 1	2	4	1	2485,618
Block 1	2	2	1	2341,441
Block 1	5	3	1	2539,217
Block 1	5	2	1,5	2533,357
Block 1	8	4	2	2560,175
Block 1	2	2	1	2351,459
Block 1	5	3	1,5	2507,152
Block 1	8	2	1	2570,14
Block 1	8	4	1	2585,099
Block 1	5	3	1,5	2486,184
Block 1	5	3	2	2578,555
Block 1	8	4	1	2628,985
Block 1	2	3	1,5	2458,32
Block 2	4	2	1	2599,252
Block 2	4	4	1,5	2609,161
Block 2	4	3	1,5	2621,062
Block 2	4	3	1,5	2637,157
Block 2	4	4	2	2638,221
Block 2	4	3	1,5	2641,871
Block 2	4	3	1,5	2652,773
Block 2	4	3	1	2653,753
Block 2	4	4	1	2667,132
Block 2	4	3	2	2683,628
Block 2	4	3	1,5	2731,778
Block 2	4	2	2	2754,189

10.2.**Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Bagaço de Cana.**

BAGAÇO DE CANA		
LABMAM	PICARRO	LABAGUAS
-13,692	-13,104	-13,537
-13,594	-12,979	-13,594
-13,484		-13,817

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	-40,770	-13,590	0,0108
Coluna 2	2	-26,083	-13,042	0,008
Coluna 3	3	-40,947	-13,649	0,022

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,506	2	0,253	17,281	0,0057	5,786
Dentro dos grupos	0,073	5	0,015			
Total	0,580	7				

DMS

	0,286		
$\bar{x}_{PICARRO} - \bar{x}_{LABAGUAS}$		0,608	
$\bar{x}_{LABMAM} - \bar{x}_{LABAGUAS}$		0,059	
$\bar{x}_{PICARRO} - \bar{x}_{LABMAM}$		0,549	

10.3.**Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Capim Elefante.**

CAPIM ELEFANTE		
LABMAM	PICARRO	LABAGUAS
-12,753	-12,291	-12,385
-12,460	-12,308	-12,434
-12,653	-12,301	-12,898

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	-37,866	-12,622	0,022
Coluna 2	3	-36,900	-12,300	0,000
Coluna 3	3	-37,717	-12,572	0,080

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,180	2	0,090	2,644	0,150	5,143
Dentro dos grupos	0,205	6	0,034			
Total	0,385	8				

10.4.**Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Lignina.**

LIGNINA		
LABMAM	PICARRO	LABAGUAS
-24,799	-24,617	-25,018
-24,766	-24,479	-25,398
	-24,610	-25,024

Anova: fator único

RESUMO					
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância	
Coluna 1	2	-49,565	-24,783	0,001	
Coluna 2	3	-73,706	-24,569	0,006	
Coluna 3	3	-75,440	-25,147	0,048	

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,510	2	0,255	11,840	0,013	5,786
Dentro dos grupos	0,108	5	0,022			
Total	0,617	7				

DMS 0,347

$\bar{x}_{PICARRO} - \bar{x}_{LABAGUAS}$ 0,578

$\bar{x}_{LABMAM} - \bar{x}_{LABAGUAS}$ 0,364

$\bar{x}_{PICARRO} - \bar{x}_{LABMAM}$ 0,214

10.5.**Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Serragem.**

SERRAGEM		
LABMAM	PICARRO	LABAGUAS
-26,508	-26,219	-26,433
-26,323	-26,254	-26,653
-26,625	-26,347	-26,494

Anova: fator único

RESUMO					
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância	
Coluna 1	3	-79,456	-26,485	0,023	
Coluna 2	3	-78,820	-26,273	0,004	
Coluna 3	3	-79,579	-26,526	0,013	

ANOVA							
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico	
Entre grupos	0,111	2	0,055	4,104	0,075	5,143	
Dentro dos grupos	0,081	6	0,013				
Total	0,192	8					

10.6.**Memória de Cálculo da Análise de Variância (ANOVA) para a Amostra de Bio-óleo de Serragem.**

BIO-ÓLEO		
LABMAM	PICARRO	LABAGUAS
-24,849	-24,409	-24,425
-24,500	-24,341	-24,676
-24,615	-24,443	-24,420
	-24,768	
	-24,386	
	-24,691	

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	-73,964	-24,655	0,032
Coluna 2	6	-147,038	-24,506	0,032
Coluna 3	3	-73,521	-24,507	0,021

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,049	2	0,025	0,842	0,462	4,256
Dentro dos grupos	0,264	9	0,029			
Total	0,313	11				