



Gilson Cruz da Silva

**Diferenciação de fontes de combustíveis fósseis e
biocombustíveis utilizando razões isotópicas de
hidrogênio, carbono e oxigênio**

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química da PUC-Rio como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Angela de Luca Rebello Wagener
Coorientadora: Dra. Maria de Fátima Guadalupe Meniconi

Rio de Janeiro
Janeiro de 2015



Gilson Cruz da Silva

**Diferenciação de fontes de combustíveis fósseis e
biocombustíveis utilizando razões isotópicas de
hidrogênio, carbono e oxigênio**

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

Profa. Angela de Luca Rebello Wagener

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

Dra. Maria de Fátima Guadalupe Meniconi

Coorientadora

PETROBRAS/CENPES

Dr. Arthur de Lemos Scofield

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Marcelo Zacharias Moreira

USP/CENA

Dr. Alexandre de Andrade Ferreira

PETROBRAS/CENPES

Profa. Adriana Haddad Nudi

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Renato da Silva Carreira

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 22 de janeiro de 2015

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

Gilson Cruz da Silva

Graduou-se em Química com Atribuições Tecnológicas na UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) em 1996. Titulou-se Mestre em Ciências com ênfase em Química Orgânica na UFRJ em 1999. Possui experiência em Geoquímica Analítica Ambiental.

Ficha Catalográfica

Silva, Gilson Cruz da

Diferenciação de fontes de combustíveis fósseis e biocombustíveis utilizando razões isotópicas de hidrogênio, carbono e oxigênio / Gilson Cruz da Silva ; orientadora: Angela de Luca Rebello Wagener ; co-orientadora: Maria de Fátima Guadalupe Meniconi. – 2015.

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

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2015.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. BTEX. 3. Gasolina. 4. Etanol. 5. Cana-de-açúcar. 6. Água. 7. Razões isotópicas. 8. Isótopos. 9. Cromatografia. I. Wagener, Angela de Luca Rebello. II. Meniconi, Maria de Fátima Guadalupe. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Dedico esta tese à minha querida mãe, Imaculada Maria Cruz da Silva (*in memoriam*), que sempre incentivou meus estudos ressaltando a importância do conhecimento como ferramenta de desenvolvimento intelectual e transformação social, às amigas Irene Terezinha Gabardo e Maria de Fátima Guadalupe Meniconi, que desde o começo incentivaram e propiciaram o desenvolvimento deste trabalho, e também à minha querida esposa Adriana Leal Luciano da Silva, pela enorme paciência, compreensão e inestimável apoio nesta etapa da minha vida.

Agradecimentos

À Deus, que me deu saúde, força e determinação para levar este trabalho até o fim.

À minha mãe Imaculada Maria (*in memoriam*).

À minha compreensiva e paciente esposa Adriana Leal.

Aos meus orientadores, Angela Wagener e Fátima Meniconi, pela oportunidade de trabalhar com pessoas tão talentosas e por compartilhar seus conhecimentos de forma tão generosa.

Aos amigos do Cenpes André Brites (*in memoriam*), Irene Gabardo, Fátima Meniconi, Leandro Macena, Fabiana Gallotta, Liliane Pequeno, Rafael Lourenço, Eleine Francione, Antônio Henrique, Alexandre Lima.

Aos amigos da PUC-Rio Arthur Scofield, Lilian Almeida, Carlos Massone, Ricardo Correa, Wellington Guedes e especialmente à Fátima Almeida, pelo seu carinho, apoio e dedicação incondicionais a mim e a todo o alunado do DQ.

Aos colegas das usinas de etanol COPRODIA, COOPERCANA, JAYORO e PAU D'ALHO.

Agradeço à PUC-Rio e PETROBRAS/CENPES por terem me proporcionado a oportunidade de cursar o doutorado.

Resumo

Silva, Gilson Cruz; Wagener, Angela de Luca Rebello. **Diferenciação de fontes de combustíveis fósseis e biocombustíveis utilizando razões isotópicas de hidrogênio, carbono e oxigênio.** Rio de Janeiro, 2015. 150p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A frota veicular brasileira utiliza largamente combustíveis fósseis, como a gasolina, e biocombustíveis, como o bioetanol, este último utilizado *in natura*, na forma hidratada, ou como aditivo para a gasolina, na forma anidra. Em caso de vazamento destes combustíveis leves para o meio ambiente, a correlação entre contaminantes e fontes suspeitas aplicando técnicas tradicionais, como a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS - *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) é extremamente difícil, pois gasolinas não possuem biomarcadores e apresentam distribuições de hidrocarbonetos semelhantes, enquanto a diferenciação inequívoca do etanol é inviável. Uma alternativa analítica recente é a Análise de Isótopos Estáveis de Compostos Específicos (CSIA - *Compound-specific stable isotope analysis*) por meio de Espectrometria de Massas de Razão Isotópica em Fluxo Contínuo (CF-IRMS - *Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry*). Neste trabalho, uma metodologia de análise isotópica aplicável à gasolina foi implementada utilizando também a extração em *Headspace* (HS-CF-IRMS). A introdução de amostras por Micro Extração em Fase Sólida (SPME - *Solid Phase Micro Extraction*), como alternativa ao *Headspace*, também foi avaliada, apresentando, no entanto, problemas técnicos que restringiram seu uso apenas aos padrões de BTEX, inviabilizando sua aplicação em amostras de gasolina nas condições testadas. Foram analisadas as razões isotópicas de hidrogênio ($\delta^2\text{H}$) de tolueno, etilbenzeno e xilenos de 38 amostras de gasolina coletadas em 12 refinarias brasileiras ao longo de várias campanhas de amostragem, visando avaliar a existência de assinaturas isotópicas específicas para cada refinaria pesquisada. Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando Análise de Variância (ANOVA), na qual foram encontrados grupos de dados estatisticamente homogêneos. A representação e análise gráfica tridimensional destes grupos de dados permitiu identificar seis refinarias com razões isotópicas específicas, assim como dois conjuntos de refinarias agrupadas por similaridade de assinaturas isotópicas na maioria dos gráficos estudados. No

entanto, devido a valores discrepantes entre campanhas distintas para algumas refinarias, os resultados preliminares obtidos neste estudo são válidos somente para as campanhas não excluídas no tratamento estatístico, não podendo, portanto, ser entendidos como uma regra geral. Com relação ao etanol, marcadores isotópicos foram utilizados e testados como ferramenta para identificação de sua origem geográfica. Neste caso, foram avaliadas as razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e hidrogênio ($\delta^2\text{H}$) do biocombustível produzido em quatro usinas localizadas em áreas de cultivo dos estados do Amazonas (Norte), Mato Grosso (Centro-Oeste), São Paulo (Sudeste) e Rio Grande do Sul (Sul), bem como os valores de $\delta^{13}\text{C}$ da cana-de-açúcar coletada nos respectivos canaviais. A técnica empregada foi CF-IRMS. Também foram determinados os perfis isotópicos de oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e hidrogênio em água da planta, do solo de cultivo, da precipitação pluviométrica e de corpos d'água associados aos canaviais das respectivas usinas, através da técnica de Espectroscopia de Infravermelho de Razão Isotópica (IRIS – *Isotope Ratio Infrared Spectroscopy*). O etanol apresentou variações sazonais de $\delta^2\text{H}$ similares às observadas para a água da planta, ressaltando a influência do ciclo hidrológico na sua razão isotópica. Foi constatado que a influência substancial e complexa do ciclo hidrológico sobre $\delta^2\text{H}$, aliada à pequena variação de $\delta^{13}\text{C}$, dificulta o uso destes isótopos como marcadores de origem do etanol.

Palavras-chave

BTEX; gasolina; etanol; cana-de-açúcar; água; razões isotópicas; isótopos; cromatografia.

Abstract

Silva, Gilson Cruz; Wagener, Angela de Luca Rebello (Advisor) **Source appointment of fossil fuels and biofuels using carbon, hydrogen and oxygen isotopic ratios.** Rio de Janeiro, 2015. 150p. DSc. Thesis - Departamento de Química - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Brazilian vehicle fleet makes wide use of fossil fuels and biofuels such as gasoline and bioethanol, the latter used neat, hydrated, or as gasoline additive, anhydrous. In case of leakage of such light fuels to the environment, correlation between contaminants and suspicious sources applying traditional techniques such as Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) is extremely difficult, since gasoline does not have biomarkers and presents similar hydrocarbons distributions, while unambiguous differentiation of ethanol is unfeasible. A recent analytical alternative is the Compound-Specific Stable Isotope Analysis (CSIA) by Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry (CF-IRMS). In this work, a methodology for isotopic analysis suitable to gasoline was implemented using also headspace extraction (HS-CF-IRMS). Sample introduction using Solid Phase Micro-Extraction (SPME) as an alternative to Headspace was also evaluated, presenting, however, technical problems which restricted its use only to BTEX standards, preventing its application in gasoline samples under the tested conditions. Analyses of hydrogen isotopic ratios ($\delta^2\text{H}$) for toluene, ethylbenzene and xylenes present in the composition of 38 gasoline samples collected in 12 Brazilian refineries were performed along several sampling campaigns, aiming at the assessment of the existence of specific isotopic signatures for each refinery studied. Results obtained were statistically evaluated using Analysis of Variance (ANOVA), yielding statistically homogeneous groups of data. Graphical representation analysis in 3D of these data sets allowed the identification of six refineries with specific isotopic ratios, as well as two sets grouped by similarity of their isotopic ratios in most of the studied plots. However, due to inconsistent values between different campaigns for some refineries, the preliminary results obtained in this study are valid only for the campaigns not excluded in the statistical treatment, therefore they cannot be understood as a general rule. Regarding to ethanol, isotopic markers were used and tested as a tool for identification of its geographical origin. In this case carbon and hydrogen isotopic ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$) were evaluated in the

biofuel produced in four sugarcane mills located in crop areas from the states of Amazonas (North), Mato Grosso (Center-West), São Paulo (Southeast) and Rio Grande do Sul (South), as well as $\delta^{13}\text{C}$ values in plants collected in respective sugarcane fields. The technique used was CF-IRMS. Also, oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) and hydrogen isotopic patterns were determined in plant-water, soil-water, rainwater, and water from reservoirs and some rivers associated to each sugarcane mill, through Isotope Ratio Infrared Spectroscopy (IRIS). Ethanol showed similar seasonal variation of $\delta^2\text{H}$ as those observed for plant-water, highlighting the influence of hydrological cycle on the isotopic fingerprint of the alcohol. It was found that the substantial and complex influence of the hydrological cycle on $\delta^2\text{H}$ and the small variations on $\delta^{13}\text{C}$ constrain the use of isotopes as tracers for ethanol origin.

Keywords

BTEX; gasoline; ethanol; sugarcane; water; isotopic ratios; isotopes; chromatography.

Sumário

1 Introdução	20
1.1. Contextualização do estudo	20
1.2. Objetivos	24
2 Revisão bibliográfica	25
2.1. Efeitos isotópicos	25
2.2. Determinação da razão isotópica	28
2.3. Notações empregadas na análise de razões isotópicas	32
2.4. Padrões para análise de razões isotópicas	33
2.5. Análise de compostos voláteis – introdução da amostra	34
2.6. Análise de amostras contendo mistura complexa não resolvida	38
2.7. Combustíveis fósseis - gasolina	39
2.8. Biocombustível – etanol	46
2.9. Influência do ciclo hidrológico na produção do etanol	51
2.10. Hipóteses	53
3 Área de estudo e amostragem para a gasolina	54
3.1. Área de estudo para a gasolina	54
3.2. Amostragem de gasolina	54
4 Metodologia para a gasolina	55
4.1. Equipamentos e materiais	55
4.2. Otimização das condições analíticas no GC-FID	57
4.3. Otimização das condições analíticas no GC-IRMS	65
4.4. Preparação do padrão isotópico de BTEX	68
5 Resultados e discussão de gasolina	71
6 Conclusões para gasolina	83

7 Metodologia para água e etanol	85
7.1. Área de estudo para água e etanol	85
7.2. Amostragem para água e etanol	88
7.3. Equipamentos, condição analíticas e preparo de amostras	89
8 Resultados e discussão de água e etanol	95
8.1. Comparação Interlaboratorial dos resultados de água da planta	95
8.2. Água de chuva, superficial e subterrânea	101
8.3. Água da planta e água do solo	107
8.4. Etanol e cana-de-açúcar	116
9 Conclusões para água e etanol	120
10 Conclusões gerais e recomendações	122
11 Referências bibliográficas	124
12 Anexos	138
12.1. Anexo 1 – Concentrações de BTEX nas amostras de gasolina A	138
12.2. Anexo 2 – Concentrações de BTEX nas soluções aquosas de gasolina	140
12.3. Anexo 3 – Perfis cromatográficos das soluções aquosas de gasolina das refinarias estudadas	142
12.4. Anexo 4 – Avaliação estatística (ANOVA) dos resultados	147

Lista de figuras

Figura 1. Exemplos típicos de valores naturais de $\delta^{13}\text{C}$ agrupados de acordo com a origem, ao longo da escala de abundância natural de $\delta^{13}\text{C}$ (Extraído de MEIER-AUGENSTEIN, 1999).	26
Figura 2. Modelo esquemático do sistema de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de Razões Isotópicas (GC-C-IRMS, extraído de SCHMIDT <i>et al.</i> , 2004).	29
Figura 3. Sistema CF-IRMS, representando esquematicamente os fornos de combustão/redução da interface Isolink, utilizada neste estudo. Adaptado de Thermo Scientific (2013).	30
Figura 4. Cromatogramas de frações de petróleo separadas por peneira molecular. Números, Pr, Ph e S representam, respectivamente, os números de átomos de carbono de cada pico de n-alcane, os isoprenóides pristano e fitano, e padrão interno ($\text{C}_{24}\text{D}_{50}$). UCM representa a mistura complexa não resolvida. Adaptado de Yamada <i>et al.</i> (1994).	39
Figura 5. Esquema simplificado do refino do petróleo para produção de gasolina.	41
Figura 6. Catalisador de FCC. Adaptada de Avidan (1993).	42
Figura 7. Mecanismos de formação dos BTEX no processo de FCC. Adaptado de Mota e Rawet (1995).	44
Figura 8. Vista panorâmica da planta de produção da Agropecuária Jayoro, localizada em Presidente Figueiredo (AM). À esquerda as facilidades de destilação de etanol, e à direita a recepção da safra de cana, imediatamente seguido pelo processo de moagem. Foto tirada pelo autor.	48
Figura 9. Análises combinadas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ em amostras de álcool retificado com origens conhecidas (Adaptado de ISHIDA-FUJII <i>et al.</i> 2005).	49
Figura 10. Diferenciação de origem geográfica de etanol de milho (Adaptado de ISHIDA-FUJII <i>et al.</i> , 2005).	49
Figura 11. Caracterização da origem geográfica de vinhos produzidos em três regiões do sul do Brasil. A) safra de 2005; B) safra de 2006 (ADAMI <i>et al.</i> , 2010).	50
Figura 12. Influência da posição (altura) durante exposição da fibra de SPME para dessorção dos analitos dentro do <i>liner</i> do injetor: a) exposição da fibra acima da zona mais aquecida do injetor; b) exposição da fibra	

na região correta do injetor. Adaptado de Blessing <i>et al.</i> (2008).	62
Figura 13. Variação das áreas dos picos dos BTEX em função do tipo de septo e do efeito <i>salting out</i> com NaCl.	63
Figura 14. Influência da agitação durante a exposição da fibra na extração por SPME (100 µm PDMS) de solução 20 µg L ⁻¹ de BTEX em água.	64
Figura 15. Variação da área dos picos dos BTEX após pré-concentração em fibra de SPME (100 µm PDMS) de solução 20 µg L ⁻¹ de BTEX em água.	65
Figura 16. Exemplos do problema na análise de $\delta^{13}\text{C}$ de BTEX em água (CF-IRMS) com pré-concentração por SPME. A) Padrão de BTEX em água sob condições normais; B) Padrão de BTEX em água após algumas injeções de amostras de gasolina em água, sem troca do liner no injetor do cromatógrafo - alargamento dos picos.	66
Figura 17. Comparação das respostas obtidas no GC-IRMS para diferentes modos de extração na análise de $\delta^{13}\text{C}$ de BTEX em gasolina (dispersa em água). A) SPME com fibra de Carboxen/PDMS de 75 µm; B) SPME com fibra PDMS de 100 µm; C) <i>Headspace</i> . Observar, pela altura dos pulsos do gás de referência (CO ₂ , mesma intensidade em todos os cromatogramas), que extração por headspace fornece a menor resposta.	67
Figura 18. Preparação das amostras de gasolina em água para análise isotópica de hidrogênio via CF-IRMS: A) Dispersão de gasolina (5 a 25 µL) em (água ultrapura, 1000 mL) e agitação magnética por 1 hora. B) imediata transferência para frascos de vidro de 40 mL dotados de tampa de rosca e septo de teflon, específicos para análise de VOCs; C) Pesagem do NaCl para processo <i>salting out</i> durante a etapa de extração em <i>headspace</i> ; D) Frascos de <i>headspace</i> (20 mL), seringas <i>gas tight</i> de 5 mL, e microseringas para preparação e transferência das amostras e padrões.	70
Figura 19. Exemplares de amostras de gasolina recebidas das refinarias para avaliação das razões isotópicas de carbono e hidrogênio no BTEX.	71
Figura 20. Representação gráfica das médias ponderadas avaliação dos resultados da análise de CSIA de carbono e hidrogênio do BTEX de 38 amostras de gasolina das 12 refinarias.	74
Figura 21. Gráficos 3D de $\delta^2\text{H}$ dos resultados da ANOVA das razões isotópicas de hidrogênio no BTEX da gasolina das refinarias avaliadas.	76
Figura 22. Gráficos de $\delta^2\text{H}$ e categorização de Tolueno; Etilbenzeno;	

m,p-Xilenos. Elipses verdes e vermelhas agrupam refinarias com base nos resultados das médias obtidas na ANOVA.	77
Figura 23. Gráficos de $\delta^2\text{H}$ e categorização de Tolueno; Etilbenzeno; o-Xilenos. Elipses verdes e vermelhas agrupam refinarias com base nos resultados das médias obtidas na ANOVA.	78
Figura 24. Gráficos de $\delta^2\text{H}$ e categorização de Tolueno; m,p-Xilenos; o-Xilenos. Elipses verdes e vermelhas agrupam refinarias com base nos resultados das médias obtidas na ANOVA.	79
Figura 25. Gráficos de $\delta^2\text{H}$ e categorização de Etilbenzeno; m,p- e o-Xilenos. Elipses verdes e vermelhas agrupam refinarias com base nos resultados das médias obtidas na ANOVA.	80
Figura 26. Área de estudo estatando a localização das usinas de cana-de-açúcar (amostragem de etanol, água, planta e solo), a precipitação típica e o padrão isotópico nas estações de referencia mais próximas dos locais de amostragem. Gráficos de dispersão: razões isotópicas de hidrogênio (superior) e oxigênio (inferior) da água de chuva (1965-1987; SP somente em 1996-1998) nas estações do GNIP. Gráfico de colunas: precipitação mensal acumulada (1961-1990) nas estações do INMET.	86
Figura 27. Ilustração da amostragem de cana-de-açúcar e solo nas campanhas de 2012. A) Amostragem de pedaço da planta; B) Amostragem de solo superficial (0-5 cm) e na profundidade das raízes (20-25 cm); C) Obtenção de amostra composta de cana coletando pedaços de planta a cada 10 metros ao longo do perímetro de um quadrado de 20 x 20 m, além de uma no centro.	89
Figura 28. Exemplos de cromatogramas da análise de carbono e de hidrogênio via CF-IRMS.	93
Figura 29. Dique de vinhaça no MT.	103
Figura 30. Linhas Locais da Água e comparação com dados de chuva do GNIP ($\text{LMWL}_{\text{GNIP}}$).	105
Figura 31. Avaliação da influência dos eventos El Niño e La Niña sobre as razões isotópicas de oxigênio e hidrogênio na precipitação (NOAA, 2014b). SPA não foi avaliada devido à indisponibilidade de dados.	106
Figura 32. Representação gráfica dos resultados do Mato Grosso (MT) para água da chuva, de rio, da planta e do solo. No detalhe: descrição dos efeitos da seca observados neste local de amostragem, adaptado a partir de: A) Allison <i>et al.</i> (1983); Clark e Fritz (1997); e B) Smith <i>et al.</i> (2005).	113

Figura 33. Linhas locais das águas do solo e da planta, e comparação com os dados de precipitação do GNIP ($LMWL_{GNIP}$).	116
Figura 34. Comparação de δ^2H para o etanol e para a água da planta.	118
Figura 35. Representação gráfica dos grupos homogêneos da ANOVA obtidos para 21 amostras de etanol coletadas em quatro regiões geográficas do Brasil.	119

Lista de tabelas

Tabela 1. Abundâncias isotópicas de alguns elementos (BENSON <i>et al.</i> , 2006)	23
Tabela 2. Propriedades físicas da H_2^{16}O , D_2^{16}O e H_2^{18}O (HOEFS, 2009)	27
Tabela 3. Precisão das determinações de abundância isotópica para alguns elementos (BRENNA <i>et al.</i> , 1997)	29
Tabela 4. Padrões de referência e respectivas razões isotópicas para a análise isotópica de carbono, hidrogênio e oxigênio (adaptado de Sessions, 2006).	34
Tabela 5. Limites de detecção efetivos* para CSIA de BTEX e álcoois, e técnicas de extração ou preparação de amostras de água. Adaptado de Hunkeler e colaboradores (2008) e Schmidt colaboradores (2004).	36
Tabela 6. Informações sobre a safra da cana-de-açúcar (SEGATO <i>et al.</i> , 2006)	46
Tabela 7. Maiores estados produtores de etanol em 2011 (BARBOSA <i>et al.</i> , 2012)	47
Tabela 8. Resultados da comparação de $\delta^{13}\text{C}$ de etanol de bebidas destiladas brasileiras e europeias, evidenciando mistura de etanol de uva e de cana nas marcas nacionais de brandy e uso unicamente de etanol de cana no conhaque de gengibre. O brandy europeu foi produzido unicamente com de etanol de uva. (PISSINATTO <i>et al.</i> , 1999)	51
Tabela 9. Testes de avaliação da coluna DB-VRX para a análise de BTEX em gasolina	59
Tabela 10. Testes de avaliação da coluna DB-624 para a análise de BTEX em gasolina	60
Tabela 11. Comparação da eficiência da dessorção do SPME utilizando septo Merlin Microseal® e septo comum. Utilizaram-se triplicatas de solução aquosa de BTEX $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Resultados em picoAmperes (pA)	61
Tabela 12. Otimização da extração de BTEX por HS-SPME em fibra de PDMS $100 \mu\text{m}$. Méida das áreas ($n=3$) obtidas em picoAmperes (pA)	63
Tabela 13. Influência da agitação durante extração de BTEX em água por HS SPME. Resultados de área em pico Amperes (pA)	64
Tabela 14. Razões isotópicas de carbono e hidrogênio dos padrões puros de	

BTEX, suportados em Chromosorb W (para $\delta^{13}\text{C}$, conforme Adami <i>et al.</i> , 2010) e em carvão ativo (para $\delta^2\text{H}$, novo método), determinadas via EA-IRMS	68
Tabela 15. Preparação da solução de padrão isotópico e Solução mãe (aquosa)	69
Tabela 16. Curva de concentração para verificar linearidade	69
Tabela 17. Resultados da implantação da metodologia de CSIA apresentados como médias de duplicata para $\delta^{13}\text{C}$ e triplicata para $\delta^2\text{H}$	72
Tabela 18. Composição das combinações de $\delta^2\text{H}$ no BTEX para avaliação em gráficos tridimensionais	75
Tabela 19. Diferenciação de gasolinas através da análise isotópica	81
Tabela 20. Razões isotópicas de carbono e hidrogênio do padrão de etanol, suportados em Chromosorb W (para $\delta^{13}\text{C}$, conforme Adami <i>et al.</i> , 2010) e em carvão ativo (para $\delta^2\text{H}$, novo método), determinadas via EA-IRMS	91
Tabela 21. Testes de significância (MILLER e MILLER, 1989) para $\delta^{18}\text{O}$ em água da planta obtido no OA-ICOS e WS-CRDS	97
Tabela 22. Testes de significância (MILLER e MILLER, 1989) para $\delta^2\text{H}$ obtidos por OA-ICOS e WS-CRDS em água da planta	99
Tabela 23. Razões isotópicas de oxigênio e hidrogênio nas amostras de água coletadas neste estudo e nas estações de referência do GNIP	102
Tabela 24. Resultados para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ na água da planta e água do solo	108
Tabela 25. Razões isotópicas médias (n=3) de hidrogênio e carbono para o etanol e a cana-de-açúcar.	117

Lista de siglas

APE	Excesso de átomo por cento (at.%)
<u>at. %</u>	Átomo por cento
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
CSIA	<i>Compound-Specific Stable Isotope Analysis</i> (Análise de Isótopos Estáveis de Compostos Específicos)
CF-IRMS	<i>Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas de Razão Isotópica em Fluxo Contínuo)
GC-C-IRMS	<i>Gas Chromatography - Combustion - Isotopic Ratio Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa – Combustão - Espectrometria de Massas de Razão Isotópica)
GNIP	<i>Global Network for Isotopes in Precipitation</i> (Rede Global de Isótopos na Precipitação)
HS	<i>Headspace</i> (Espaço superior não preenchido em um recipiente tampado contendo amostra)
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i> (Agência Internacional de Energia Atômica)
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IRIS	<i>Isotope Ratio Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Infravermelho de Razão Isotópica)
IRMS	<i>Isotope Ratio Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas de Razão Isotópica)
MTBE	Metil-terc-butil-éter
NAPL	<i>Non aqueous phase liquid</i> (fase líquida não aquosa)
NIST	National Institute for Standards and Technology, EUA
OA-ICOS	<i>off-axis integrated cavity output spectroscopy</i> (espectroscopia de cavidade integrada fora do eixo)
PDB	Belemnite PeeDee
PDMS	Polidimetilsiloxano
P&T	<i>Purge and Trap</i> (Purga e Retenção)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
VSMOW	<i>Vienna Standard Mean Ocean Water</i> (Padrão Médio das

	Águas Oceânicas de Viena)
SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i> (Micro Extração em Fase Sólida)
VOCs	Volatile Organic Compounds (Copostos Orgânicos Voláteis)
VPDB	Vienna belemnite PeeDee
WS-CRDS	<i>Wavelength-Scanned Cavity Ring-Down Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Cavidade Ressonante tipo <i>Ring-Down</i> escaneada por comprimento de onda)

1

Introdução

1.1. Contextualização do estudo

O atendimento das necessidades humanas do mundo moderno tem pressionado cada vez mais o meio ambiente, seja pelo esgotamento dos recursos naturais, como o petróleo e outras jazidas minerais, com os consequentes impactos associados a sua extração, seja pela contaminação dos recursos naturais hídricos, ou da atmosfera, devido ao aumento das emissões líquidas ou em fase gasosa. Outro impacto importante diz respeito à expansão das fronteiras agrícola e pecuária, devido ao desmatamento de biomas naturais para criação de pastagens para animais ou para plantações de espécies de interesse econômico, como o eucalipto, a soja e a cana-de-açúcar.

Atualmente, enorme esforço tem sido despendido para mitigar os impactos ambientais, como o efeito estufa, diretamente relacionado às emissões geradas pela matriz energética mundial, que se baseia principalmente na queima de combustíveis fósseis, como o carvão e derivados de petróleo. Entre as alternativas mais promissoras encontram-se os biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel, que podem ser obtidos de diversas plantas. A principal vantagem seria o uso de um recurso renovável que não aumentaria a concentração do carbono na atmosfera, pois este seria novamente sequestrado pelas próprias plantações, fechando deste modo o ciclo.

No Brasil, o uso de biocombustíveis tem aumentado ao longo das últimas décadas, e sua participação na matriz energética nacional deve ser ainda mais relevante no futuro. Etanol e biodiesel são tipos de biocombustíveis utilizados no setor de transportes, e o Brasil foi responsável por 41 % da produção mundial de etanol em 2006. Este biocombustível pode ser produzido a partir de variados tipos de vegetais, como milho, batata, trigo, cana-de-açúcar e beterraba, no entanto a cana-de-açúcar é uma das mais importantes fontes de etanol devido à sua elevada eficiência fotossintética de 2,5 % (NETO E CUNHA, 2008). Entre 1975 e 2006 a produção brasileira de etanol teve um crescimento de 413 %, passando de 88,9 milhões para 456 milhões de toneladas, com aumento da área plantada de 1,9 milhões para 6,2 milhões de hectares (aumento de 226,3 % da

área). Um marcante ganho de eficiência na produção entre 1980 e 1990 foi possível devido à introdução de novas variedades de cana-de-açúcar, desenvolvidas no Brasil, uso de vinhaça como fertilizante, controle biológico da broca da cana, otimização das operações agrícolas, entre outros (TRIVELIN E VITTI, 2005; MORAES, 2007; SILVA *et al.*, 2007).

Apesar do ganho ambiental para o clima no planeta acarretado pelo uso dos biocombustíveis, fica evidente, por outro lado, a questão inicialmente levantada da necessidade de área cultivável para a expansão das plantações, reafirmando a complexidade do tema. Paralelamente a esta discussão existe a necessidade de evitar outros impactos deletérios ao meio ambiente, os quais estão relacionados com o transporte e distribuição dos combustíveis e biocombustíveis. Tais impactos podem advir, por exemplo, de acidentes rodoviários envolvendo caminhões tanque, rompimento de dutos ou vazamento em tanques de armazenamento. Este último caso chama particularmente a atenção devido aos postos de abastecimento amplamente distribuídos nos centros urbanos.

Somente nos Estados Unidos da América foram registrados vazamentos de gasolina em 380.000 tanques de combustível no subsolo (HUNKELER *et al.*, 2001) o que torna a gasolina um dos maiores contaminantes das águas subterrâneas do país (SMALLWOOD *et al.*, 2002). Com relação ao Brasil, onde existem cerca de 27.000 postos de combustíveis (TIBURTIUS *et al.*, 2004), não foi encontrado nenhum estudo apresentando estimativas em nível nacional sobre vazamentos. No entanto, segundo a CETESB (2010), até novembro de 2009 existiam 2.279 registros de áreas contaminadas por estes estabelecimentos no estado de São Paulo. Um estudo da presença de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em amostras de água de poços de monitoramento de postos de combustível do estado do Rio de Janeiro (REGO E NETTO, 2007) mostrou que, dentre 56 amostras analisadas ao longo dos anos de 2004 e 2005, 30 delas apresentaram-se contaminadas com BTEX em concentrações de até 83,5 mg L⁻¹.

Um grande desafio nos estudos ambientais envolvendo vazamentos de combustíveis é a investigação de fontes, transporte e destino de contaminantes orgânicos no subsolo. Quando uma fase líquida não aquosa (NAPL - *non aqueous phase liquid*) é liberada no solo, ela migra por ação da força da gravidade através da zona não saturada. Por ação de forças de capilaridade, parte desta fase fica retida nos poros do solo enquanto outra parte sofre espalhamento lateral, que depende também de características do solo (VAN KEER *et al.*, 2008). Se um volume suficiente desta NAPL for liberado, ela migrará até atingir uma região de

baixa permeabilidade ou mesmo o lençol freático, onde passará a se mover lateralmente acima da fase aquosa, ou migrará para regiões ainda mais profundas, caso seja mais densa do que a água (VAN KEER et al, 2008).

Uma vez identificada a existência de uma contaminação ambiental, faz-se necessário apurar as responsabilidades e realizar a remediação do dano na área atingida. No entanto, muitas vezes devido à proximidade entre dois ou mais postos, à limitação das técnicas analíticas tradicionais e à biodegradação, torna-se difícil determinar a fonte de um vazamento no subsolo. Embora a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS - *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) seja muito utilizada para a caracterização das águas subterrâneas e solos contaminados, as correlações de contaminantes com fontes suspeitas são extremamente difíceis através dessas técnicas porque gasolinas não possuem biomarcadores geoquímicos e apresentam distribuições de hidrocarbonetos semelhantes.

Uma alternativa analítica relativamente para contornar o problema descrito é a Análise Isotópica de Compostos Específicos (CSIA - *Compound-Specific Stable Isotope Analysis*) por meio de Espectrometria de Massas de Razão Isotópica (IRMS - *Isotopic Ratio Mass Spectrometry*), após combustão *on line* (C) de compostos separados por cromatografia gasosa, técnica muitas vezes representada pela sigla GC-C-IRMS (*Gas Chromatography – Combustion – Isotopic Ratio Mass Spectrometry*). Esta técnica, devido a sua capacidade de medir a distribuição isotópica em nível de abundância natural com grande acurácia e alta precisão, tem sido cada vez mais a ferramenta escolhida no controle de autenticidade de produtos alimentícios e determinação de origem em arqueologia, geoquímica e química ambiental na comunidade científica (MEIER-AUGENSTEIN, 1999).

Isótopos são átomos de um elemento químico cujo núcleo contém o mesmo número de prótons e um diferente número de nêutrons, e podem ser divididos em estáveis e instáveis (radioativos). A abundância relativa dos diferentes isótopos de um elemento pode variar substancialmente, como mostra a Tabela 1. Pouco tempo após a determinação da abundância isotópica natural, no início do século XX, diversos estudos constataram a existência de variações ligadas à origem dos materiais, como por exemplo, a maior concentração de ^{13}C em carbonatos do que em carbono orgânico (NIER e GULBRANSEN, 1939; BRENNAN et al., 1997). A variação isotópica devido a processos naturais é conhecida em todas as áreas das ciências naturais, e fornece importantes dados sobre diversos fenômenos, tais como a respiração das árvores, dieta de povos

antigos e animais contemporâneos, taxas de nitrificação em florestas, biodegradação e história do clima (BRENNAN *et al.*, 1997).

Tabela 1. Abundâncias isotópicas de alguns elementos (BENSON *et al.*, 2006)

Elemento	Isótopos	Abundância (%)
Hidrogênio	^1H	99,984
	^2H	0,0156
Carbono	^{12}C	98,892
	^{13}C	1,108
Nitrogênio	^{14}N	99,635
	^{15}N	0,365
Oxigênio	^{16}O	99,759
	^{17}O	0,037
	^{18}O	0,204
Enxofre	^{32}S	95,02
	^{33}S	0,76
	^{34}S	4,22
	^{36}S	0,014

A diferenciação de fontes de contaminação por gasolina ou por etanol utilizando a técnica de IRMS oferece a possibilidade de avaliação dos componentes majoritários presentes através da avaliação das distribuições isotópicas de compostos específicos (C, H e O) das séries de hidrocarbonetos lineares e/ou aromáticos, uma vez que os efeitos de degradação na composição isotópica de carbono destas moléculas não são tão efetivos quanto na composição molecular (O'MALLEY *et al.*, 1994; BENSON *et al.*, 2006). O método de CSIA apresenta grande potencial para diferenciação de origem de contaminação de lençol freático por vazamento de combustíveis e biocombustíveis, especialmente de tanques de armazenamento, produzindo perfis de distribuição isotópica que possibilitam a discriminação da origem das amostras analisadas (SMALLWOOD *et al.*, 2002). Pode auxiliar nos estudos de correlação entre os compostos presentes na matriz em estudo e na amostra original, diminuindo os desafios da identificação da origem de compostos leves em amostras ambientais.

1.2. Objetivos

Objetivos Gerais

- Verificar se a gasolina produzida em diferentes refinarias de petróleo possui razão isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$) distinta suficiente para uso em identificação de origem.
- Verificar se o álcool produzido em diferentes regiões do Brasil possui razão isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$) distinta suficiente para uso em identificação regional de origem.

Objetivos Específicos

- Otimizar as condições analíticas para CSIA aplicada a hidrocarbonetos de petróleo, usando Micro Extração em Fase Sólida ou Headspace para pré-concentração e injeção de analitos voláteis no sistema cromatográfico;
- Determinar as razões isotópicas de carbono e hidrogênio na gasolina produzida em diversas refinarias de petróleo do Brasil;
- Avaliar a existência de padrões regionais de distribuição isotópica de carbono e hidrogênio no etanol produzido a partir da cana-de-açúcar, e de hidrogênio e oxigênio para as prováveis fontes de água dos canaviais;
- Estabelecer um método analítico baseado em razões isotópicas de carbono e hidrogênio para correlacionar o etanol de cana com a sua região produtora

2

Revisão bibliográfica

2.1. Efeitos isotópicos

Variações naturais na composição de elementos leves ocorrem devido ao chamado fracionamento isotópico, o qual resulta em valores de razão isotópica específicos e característicos da origem, pureza e processo de fabricação dos produtos e de seus constituintes. O fracionamento isotópico pode ocorrer durante processos químicos, físicos e biológicos, e os dois principais mecanismos deste fracionamento são os efeitos isotópicos cinéticos, produzidos por diferenças nas velocidades de reação, e os efeitos isotópicos termodinâmicos, relacionados com o estado de energia de um sistema (BENSON *et al.*, 2006; HOEFS, 2009; PHILP E KUDER, 2008).

Os efeitos isotópicos cinéticos resultam das diferenças de força de ligação, e, para que o efeito isotópico seja observado, é preciso que a quebra de ligação seja a etapa lenta da reação. Por exemplo, se a etapa lenta for a formação de um complexo com uma enzima, nenhum efeito será observado. O isótopo mais leve de um elemento forma ligações mais fracas, sendo portanto, mais reativo e ficando mais concentrado no produto, enquanto o mais pesado concentra-se no material de partida. Nos processos de biodegradação, devido à limitação de tamanho necessário para permear a membrana celular, as moléculas pequenas apresentam maior possibilidade de fracionamento isotópico, como é o caso de compostos voláteis como mono-aromáticos, etanos e etenos clorados. A biodegradação de semivoláteis, como n-alcanos de cadeia longa, HPA maiores e bifenilas policloradas (PCB – *polychlorinated biphenyls*) tipicamente não causa fracionamento isotópico significativo para carbono (PHILP E KUDER, 2008), embora seja observado para hidrogênio (FERREIRA, 2012).

Outro exemplo importante de fracionamento isotópico cinético é o que resulta na incorporação seletiva de ^{12}C na matéria orgânica durante a fotossíntese. A natureza das plantas e o tipo de ciclo fotossintético, seja Calvin (C3), Hatch-Slater (C4) ou metabolismo ácido das Crassulaceae (CAM), determina o grau de assimilação preferencial deste isótopo, resultando em um empobrecimento de 5-25 ‰ (per mil) em ^{13}C . As plantas C4 são normalmente

associadas a climas mais quentes e áridos e, em geral, têm valores de $\delta^{13}\text{C}$ na faixa de -10 a -18 ‰. As plantas C3, que representam 85 % das espécies e dominam a maioria dos ecossistemas terrestres, estão geralmente associados a climas mais frios e úmidos e têm valores isotópicos mais leves na faixa de -22 a -30 ‰ (PHILP E KUDER, 2008).

A vegetação natural nas regiões temperadas e de alta latitude, assim como as florestas tropicais, são quase exclusivamente C3, juntamente com as principais culturas, como trigo, centeio, cevada, legumes, algodão, tabaco, tubérculos (incluindo beterraba-de-açúcar) e gramíneas. As plantas C4 representam menos de 5 % das espécies florais, mas predominam em ecossistemas quentes e abertos, como pastagens tropicais e temperadas, e incluem plantas comuns, como a cana-de-açúcar, milho e sorgo. Plantas do deserto, como os cactos, operam sob outro mecanismo de fotossíntese referido como o ciclo CAM e pode operar em ambos os ciclos de C3 e C4. A Figura 1 apresenta exemplos típicos de valores naturais de $\delta^{13}\text{C}$ agrupados de acordo com a origem, ao longo da escala de abundância natural de $\delta^{13}\text{C}$ (BENSON *et al.*, 2006; PHILP, 2007; MEIER-AUGENSTEIN, 1999).

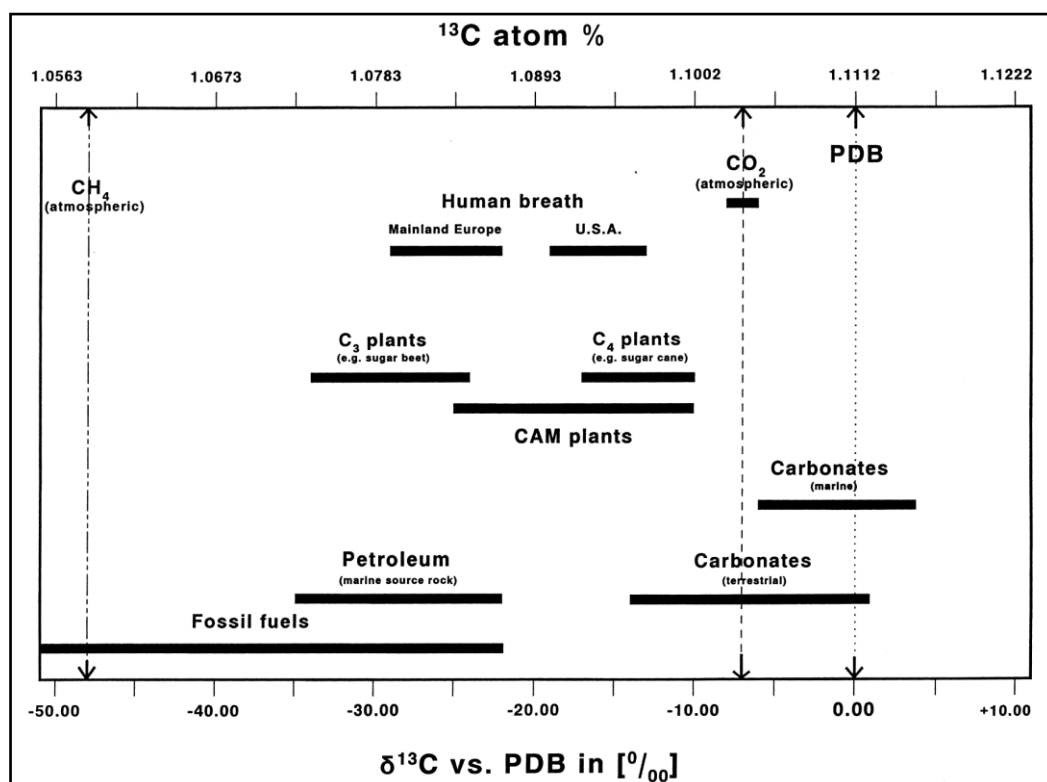


Figura 1. Exemplos típicos de valores naturais de $\delta^{13}\text{C}$ agrupados de acordo com a origem, ao longo da escala de abundância natural de $\delta^{13}\text{C}$ (Extraído de MEIER-AUGENSTEIN, 1999).

Segundo Philp e Kuder (2008), o intemperismo e a biodegradação não afetam as razões isotópicas de muitos tipos de contaminantes importantes. No entanto, mudanças diagenéticas pós-derrame, especialmente a biodegradação, podem alterar as assinaturas de certas classes em relação à fonte original, impedindo correlações confiáveis. As razões isotópicas de carbono e hidrogênio de contaminantes orgânicos são, na maioria dos casos, relativamente similares aos dos precursores de produção, como no caso do petróleo em relação às frações destiladas, metano, biomassa C3 ou C4 usadas na fabricação de produtos orgânicos que venham a se tornar poluentes caso sejam liberados no meio ambiente (PHILP e KUDER, 2008).

O efeito isotópico termodinâmico está relacionado com a variação de energia livre que ocorre quando um átomo em um composto é substituído por seu isótopo, e está associado a diferenças nas propriedades físico-químicas do composto, incluindo pressão de vapor, ponto de ebulição e ponto de fusão, que estão relacionados com os níveis de energia de vibração (BENSON *et al.*, 2006). Algumas diferenças nas propriedades físicas das moléculas de H_2^{16}O , D_2^{16}O e H_2^{18}O são apresentadas na Tabela 2, onde se pode checar que as suas propriedades são qualitativamente iguais, mas quantitativamente diferentes devido somente à substituição isotópica (HOEFS, 2009).

Tabela 2. Propriedades físicas da H_2^{16}O , D_2^{16}O e H_2^{18}O (HOEFS, 2009)

Propriedade	H_2^{16}O	D_2^{16}O	H_2^{18}O
Densidade (a 20 °C, em g cm^{-3})	0,997	1,1051	1,1106
Temperatura de maior densidade (°C)	3,98	11,24	4,30
Ponto de fusão (760 Torr, em °C)	0,00	3,81	0,28
Ponto de ebulição (760 Torr, em °C)	100,00	101,42	100,14
Pressão de vapor (a 100 °C, em Torr)	760,00	721,60	–
Viscosidade (a 20 °C, em centipoise)	1,002	1,247	1,056

Esses efeitos são evidentes em processos onde não ocorrem quebra ou formação de ligação, como destilação e processos de partição entre duas fases. Além disso, os processos de evaporação-condensação merecem especial interesse, pois diferenças na pressão de vapor de compostos isotopicamente diferentes levam a fracionamentos isotópicos significativos (HOEFS, 2009). Por exemplo, durante a evaporação da água, mais HDO permanece na fase líquida do que H_2O , mais volátil. Quando a água evapora de climas mais quentes, perto

do Equador, o seu vapor, enriquecido em H₂O, atinge as regiões mais frias da Terra e se condensa novamente, resultando em baixa concentração de HDO nas regiões polares em relação ao Equador (ISHIDA-FUJII, 2005, MONETTI *et al.*, 1994).

Em geral, os estudos de volatilização com Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs - *Volatile Organic Compounds*) mostram pequeno fracionamento isotópico para o carbono, mais pronunciado para o cloro, e em alguns casos, forte para o hidrogênio. De fato, enriquecimento em ¹³C e empobrecimento em ³⁷Cl na fase vapor, em equilíbrio com NAPL, foram relatados para vários compostos clorados, mono-aromáticos, hidrocarbonetos (PHILP e KUDER, 2008).

2.2. Determinação da razão isotópica

A espectrometria de massas, uma das técnicas mais importantes da atualidade para a caracterização de estrutura molecular, composição elementar e quantificação, teve, em seus primórdios, um uso predominante na determinação nominal das abundâncias isotópicas dos elementos terrestres. Embora todos os espectrômetros de massas possam medir abundâncias isotópicas, a grande diferença entre um IRMS e um MS tradicional reside na alta precisão da medição, que é definida geralmente como um desvio padrão na faixa de 4-6 algarismos significativos (Tabela 3). Esta alta precisão, no entanto, é alcançada em detrimento da flexibilidade de uso do instrumento, pois o equipamento de IRMS aceita o analito na forma de apenas um dentre poucos gases, e este gás deve ser isotopicamente representativo da amostra original. Desta forma, as análises de ¹³C/¹²C, ²H/¹H, ¹⁵N/¹⁴N, ¹⁸O/¹⁶O e ³⁴S/³²S são realizadas através da análise de gases puros de CO₂, H₂, N₂, N₂O, NO, O₂, CO e SO₂ ou SF₆, os quais, operando em fluxo contínuo, são analisados geralmente utilizando hélio como gás de arraste. Estes são, portanto, os únicos gases admitidos na fonte de íons do IRMS (BRENNAN *et al.*, 1997).

Tabela 3. Precisão das determinações de abundância isotópica para alguns elementos (BRENNAN *et al.*, 1997)

Elemento	Isótopo minoritário	Abundância natural (%)
Hidrogênio	^2H (D)	0,015 57
Carbono	^{13}C	1,111 40
Nitrogênio	^{15}N	0,366 30
Oxigênio	^{18}O	0,200 04
Enxofre	^{34}S	4,215 00

Para alcançar a acurácia e alta precisão necessária para a análise de razões isotópicas é fundamental que nenhuma parte do analito seja perdida. No caso do CO_2 , os dados compreendem três íons traçadores para os diferentes isotopômeros $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ e $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$, com relações massa/carga respectivas de m/z 44, 45 e 46. Os três feixes de íons são registrados simultaneamente por um arranjo múltiplo de copos de Faraday, com um copo dedicado a cada isotopômero. As correntes de íons resultantes são continuamente monitoradas, digitalizadas e transferidas para o computador, onde a área do pico de cada isotopômero é integrada quantitativamente e as razões correspondentes são calculadas (MEIER-AUGENSTEIN, 1999). A Figura 2 apresenta esquematicamente um sistema GC-C-IRMS.

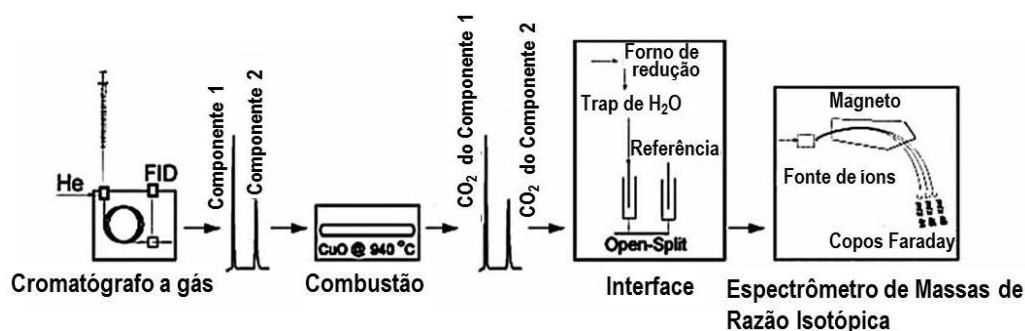


Figura 2. Modelo esquemático do sistema de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de Razões Isotópicas (GC-C-IRMS, extraído de SCHMIDT *et al.*, 2004).

Nos equipamentos tipo Fluxo Contínuo (CF-IRMS - *Continuous Flow*) cada composto orgânico, ao eluir da coluna cromatográfica, é convertido nos referidos gases simples ao atravessar um microreator capilar por meio de duas técnicas de conversão (Figura 3). A combustão em uma temperatura elevada é aplicada para determinação de ^{13}C e ^{15}N , e converte os compostos de interesse em CO_2 , N_2 e H_2O em temperatura de até $1100\text{ }^\circ\text{C}$ e com remoção *on-line* automática da água gerada no processo de oxidação. A determinação das razões $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ é realizada por pirólise em alta temperatura, processo que converte o hidrogênio de moléculas orgânicas em H_2 a aproximadamente $1450\text{ }^\circ\text{C}$ e o oxigênio de moléculas orgânicas em CO a $1280\text{ }^\circ\text{C}$ em reatores capilares inertes e redutores. Uma grande vantagem dos novos equipamentos é que o *software* de controle realiza o direcionamento do fluxo do cromatógrafo para o reator de combustão ou pirólise, permitindo analisar ^{13}C e ^{15}N ou ^{18}O e ^2H em uma única análise, o que torna a operação do equipamento bastante semelhante a dos sistemas clássicos de GC-MS.

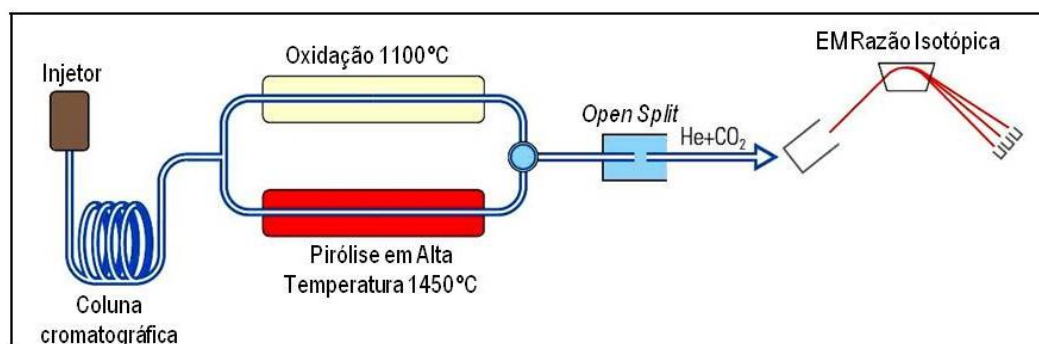


Figura 3. Sistema CF-IRMS, representando esquematicamente os fornos de combustão/redução da interface Isolink, utilizada neste estudo. Adaptado de Thermo Scientific (2013).

Para obter a maior precisão possível, as análises de razão isotópica exigem a comparação de amostras e padrão em cada cromatograma. Existem dois passos para essa padronização (SESSIONS, 2006):

- Passo 1: Vários padrões de composições isotópicas conhecidas devem ser introduzidos nos intervalos de eluição entre os analitos, e o mais próximos destes quanto possível.
- Passo 2: Padrões e amostras devem ser manipulados e tratados analiticamente da maneira mais similar possível, para minimizar o impacto

do fracionamento isotópico devido à injeção, cromatografia, conversão química, transferência de gás, etc.

O primeiro passo é adequadamente atingido pela introdução de um gás de referência (CO_2 , H_2 , N_2 , etc.) de um reservatório de composição isotópica conhecida. Esse processo é frequentemente realizado através da adição de uma segunda, pequena, corrente de hélio - tipicamente $30 \mu\text{L min}^{-1}$ ou menos - fluindo diretamente para dentro da fonte de íons do IRMS. Os picos de gás de referência são adicionados a esta segunda corrente carreadora ou por válvula de amostragem rotativa ou, mais comumente, por um arranjo de capilares móveis, combinando assim os benefícios da utilização de um gás de referência único, cuja composição isotópica pode ser medida com grande precisão, com a flexibilidade de introduzir padrões sempre que necessário. Por outro lado, existe a desvantagem do segundo passo não ser alcançado, pois os picos de gás de referência não experimentam as mesmas condições que os picos do analito, particularmente no que diz respeito à interface de conversão química (SESSIONS, 2006).

Para fornecer um tratamento idêntico da amostra e do padrão, a abordagem mais usada é a coinjeção de padrões orgânicos com composição isotópica conhecida e, idealmente, composição química semelhante à dos analitos. No entanto, para que isso funcione, é preciso haver disponibilidade de padrões que eluam em regiões do cromatograma sem a presença de analito. A preparação e análise isotópica de padrões orgânicos múltiplos são demoradas, mas nos casos em que misturas simples são analisadas de forma rotineira, como, por exemplo, ácidos graxos de óleos vegetais, esta abordagem pode funcionar bem. Para amostras ambientais, nas quais regiões cromatográficas sem analito são raras ou inexistentes e, frequentemente, variam de acordo com cada amostra, a coinjeção de padrões múltiplos torna-se problemática (SESSIONS, 2006).

2.3. Notações empregadas na análise de razões isotópicas

Nos trabalhos com IRMS pequenas variações em quantidades muito pequenas de um isótopo são detectadas em presença de grandes quantidades do isótopo mais leve. A abundância A_s do isótopo mais pesado n_2 em uma amostra s , dada em átomo por cento (at.%) é definida como (MEIER-AUGENSTEIN, 1999):

$$A_s = R_s / (1 + R_s) \times 100 \text{ (at.\%)}$$

Onde R_s é a razão n_2 / n_1 dos dois isótopos para a amostra.

O enriquecimento de um isótopo em uma amostra, quando comparado com o valor de um padrão (A_{std}), é dado em excesso de at.% (APE) (MEIER-AUGENSTEIN, 1999):

$$APE = A_s - A_{std}$$

Como as pequenas variações do isótopo mais pesado usualmente medidas por IRMS são da ordem de 0,001 a 0,05 at.%, a notação delta (δ) em unidades de per mil (‰) foi adotada para reportar as mudanças na abundância isotópica como um desvio per mil comparado com um determinado padrão isotópico (MEIER-AUGENSTEIN, 1999):

$$\delta = (R_s / R_{std} - 1) \times 1.000 \text{ (‰)}$$

Onde R_s é a razão isotópica medida para uma amostra e R_{std} é a razão isotópica medida para um padrão.

Segundo Sessions (2006), a notação delta serve a três funções úteis. Primeiro, ela enfatiza o fato de que a medição das abundâncias de isótopos estáveis é relativa, e não absoluta, e que as incertezas em abundância isotópica absoluta são sempre muito superiores que as em abundância relativa. Em segundo lugar, a notação delta permite focar e reportar compactamente alterações muito pequenas na razão isotópica, eliminando muitas casas decimais imutáveis, comuns a praticamente todas as substâncias (menos as artificialmente enriquecidas). Assim, uma amostra de água com uma relação $^2\text{H} / ^1\text{H}$ de 0,0001568, por exemplo, seria relatada como $\delta^2\text{H} = 6,7 \pm 1,3 \text{ ‰}$. Os

termos utilizados na análise isotópica incluem valor "del" (delta), "delta-del" (a diferença entre dois valores de delta, equivalente ao fracionamento isotópico), e valores de delta "pesados" ou "leves" (enriquecido ou empobrecido no isótopo pesado), mas o uso destes termos na forma escrita é desaconselhável. Terceiro, os valores de delta podem, com boa aproximação, ser adicionados linearmente, o que facilita bastante muitos cálculos. Por exemplo, a composição isotópica de uma mistura equimolar de duas amostras de água com valores de $\delta^2\text{H}$ de 0,0 e -24,0 ‰ seria -12,0 ‰ (BRENNA *et al.*, 1997; SESSIONS, 2006).

2.4. Padrões para análise de razões isotópicas

Como as variações nas determinações de razão isotópica dizem respeito a apenas algumas partes por mil em massa, e não há razões universais absolutas que possam ser usadas como referência, é necessário definir padrões aos quais são arbitrariamente atribuídos valores delta iguais a 0 ‰. Um valor δ negativo indica que a amostra é leve, ou empobrecida do isótopo pesado em relação ao padrão, enquanto um valor positivo indica que a amostra é isotopicamente pesada, ou enriquecida do isótopo pesado em relação ao padrão (SESSIONS, 2006).

Para definição dos padrões, amostras de certas substâncias são produzidas e disponibilizadas principalmente em dois grandes centros, o IAEA (*International Atomic Energy Agency*, Áustria) e o NIST (*National Institute for Standards and Technology*, EUA). Quando estes padrões primários não se encontram disponíveis, uma possibilidade é o uso de padrões alternativos, os quais precisam ser relacionados com precisão aos primários. Por exemplo, o material PDB (belemnita da formação PeeDee, Carolina do Sul, EUA), usado como um padrão para a proporção de isótopos de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, já está esgotado, e foi substituído pelo VPDB (*Vienna belemnite PeeDee*), cuja composição isotópica é conhecida com precisão em relação ao PDB. Da mesma forma o Padrão Médio das Águas Oceânicas de Viena - VSMOW (*Vienna Standard Mean Ocean Water*), é o padrão recomendado para oxigênio ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) e hidrogênio ($^2\text{H}/^1\text{H}$) (SESSIONS, 2006). A Tabela 4 apresenta as razões isotópicas destes padrões.

Tabela 4. Padrões de referência e respectivas razões isotópicas para a análise isotópica de carbono, hidrogênio e oxigênio (adaptado de Sessions, 2006).

Padrão de Referência (nome)	Isótopos	Razão isotópica	Delta (‰)
Água (VSMOW)	$^2\text{H}/^1\text{H}$	0,00015576	0,00
Carbonato (VPDB)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0,011224	0,00
Água (VSMOW)	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,0020052	0,00

2.5. Análise de compostos voláteis – introdução da amostra

A introdução das amostras no sistema analítico torna-se crítica no caso de analitos voláteis em matriz aquosa. A análise por IRMS necessita da introdução de cerca de 1 nmol de carbono ou 8 nmol de hidrogênio na coluna para obter medições de razões isotópicas acuradas e precisas (HUNKELER *et al.*, 2008). Estes critérios são válidos para o sistema GC-IRMS ajustado (*tunning*) para máxima linearidade e resolução cromatográfica maior do que 1,5, o que resulta em picos finos e com boa separação (HUNKELER *et al.*, 2008).

Segundo Hunkeler e colaboradores (2008), de acordo com estes critérios, para estimar a massa mínima para injeção de um determinado composto pode-se usar as fórmulas:

$$m_i = 1 \text{ nmol } M_i / x \quad (\text{para o carbono})$$

$$m_i = 8 \text{ nmol } M_i / x \quad (\text{para o hidrógeno})$$

Onde **mi** é a massa necessária em ng, **x** é o número de átomos de carbono ou hidrogênio, respectivamente no composto, e **Mi** é o peso molecular do composto em g mol⁻¹ (HUNKELER *et al.*, 2008).

Portanto, exemplificando a extração de metil-terc-butil-éter (MTBE) por *headspace* em uma amostra de 10 mL de água, seria necessária uma concentração deste composto de 170 µg L⁻¹ para análise de razões isotópicas de carbono e 550 µg L⁻¹ para hidrogênio. Fica evidente através deste exemplo a

necessidade de integração da IRMS com técnicas eficientes de extração ou pré-concentração, uma vez que amostras ambientais raramente apresentam tais níveis de concentração de poluentes (HUNKELER *et al.*, 2008).

Idealmente, a técnica de extração ou pré-concentração deve ser livre de efeitos de fracionamento isotópico e deve ser adequada para concentrar material suficiente para permitir que cada composto de interesse possa ser analisado em concentrações relevantes aos estudos aos quais se destinam. Para o caso de compostos voláteis e relativamente solúveis em água, como BTEX, MTBE e etilenos voláteis, a maioria dos estudos emprega técnicas de extração por sorção, como Micro Extração em Fase Sólida (SPME – *Solid Phase Micro Extraction*) ou *Purge and Trap* (P&T) (HUNKELER *et al.*, 2008).

A Tabela 5 apresenta um resumo dos limites de detecção efetivos (operacionais, baseados no critério de 1 nmol de C e 8 nmol de H) reportados para várias técnicas usadas na preparação de amostras para CSIA de BTEX e alguns álcoois. A sensibilidade se correlaciona com a concentração molar de carbono e hidrogênio na amostra (HUNKELER *et al.*, 2008).

No caso da análise isotópica de nitrogênio e oxigênio, os limites de detecção são fornecidos pelo fabricante do equipamento, mas há poucos métodos disponíveis para extração e preparação das amostras, ou protocolos disponíveis para CSIA (HUNKELER *et al.*, 2008).

Os dois principais pré-requisitos para seleção de uma técnica de extração ou pré-concentração adequada são (HUNKELER *et al.*, 2008):

- Boa sensibilidade e mudança negligenciável do valor de delta (ou pelo menos uma mudança altamente reprodutível). É mandatória a avaliação da técnica quanto existência de fracionamento isotópico no processo analítico que leve à alterações nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ dos analitos de interesse, a não ser que tal fracionamento seja altamente reprodutível. Essa avaliação deve cobrir a todas as condições operacionais;
- O desvio padrão das replicatas deve ser menor do que $\pm 0,5\text{‰}$ para carbono, caso contrário o método não é adequado;

Normalmente, os métodos de pré-concentração por SPME (no *headspace* ou por imersão direta da fibra na amostra) não são acompanhados de fracionamento isotópico de carbono e hidrogênio (HUNKELER *et al.*, 2008).

Tabela 5. Limites de detecção efetivos* para CSIA de BTEX e álcoois, e técnicas de extração ou preparação de amostras de água. Adaptado de Hunkeler e colaboradores (2008) e Schmidt colaboradores (2004).

Composto	Técnica de extração / preparação	Mudança no valor de $\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^2\text{H}$ durante a análise	Definição do Limite de Detecção	Limite de Detecção Operacional* ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Referência
				$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$	
Benzeno	Injeção líquida ^a	nms ^e	Amplitude > 0,5 V	19000	–	(ZWANK <i>et al.</i> , 2003)
	Injeção via HS	nms ^e	Amplitude > 0,5 V	500	–	(ZWANK <i>et al.</i> , 2003)
	SPME por imersão direta	nms ^e	Amplitude > 0,5 V	22	–	(ZWANK <i>et al.</i> , 2003)
	P&T	nms ^e	Amplitude > 0,5 V	0,30	–	(ZWANK <i>et al.</i> , 2003)
	P&T	n.r. ^d	Média dentro do intervalo $\pm 0,5 \text{ ‰}$ e $\delta < 0,5 \text{ ‰}$	0,20	–	(JOCHMANN <i>et al.</i> , 2006)
Tolueno	Injeção líquida ^a	OC ^b nms ^e SL ^c $\sim -1 \text{ ‰}$	Amplitude > 0,5 V	9500	–	(ZWANK <i>et al.</i> , 2003)
	Injeção via HS	nms ^e	Amplitude > 2 V	–	2000	(WARD <i>et al.</i> , 2000)
	Injeção via HS	nms ^e	Amplitude > 0,2 V	100	–	(SLATER <i>et al.</i> , 1999)
	SPME por imersão direta	nms ^e	Área do pico equivalente a 50 pmol CO ₂ na fonte de íons (Ca. 0,7 Vs)	45	–	(DIAS e FREEMAN, 1997)

* limites operacionais, baseados no critério de 1 nmol de C e 8 nmol de H; **a)** Analito dissolvido em solvente; **b)** Injeção *on column*; **c)** Injeção *splitless*; **d)** Não reportado na referência; e) Nenhuma mudança significativa (<0.5 ‰) observada. HS: *Headspace*

Tabela 5. (continuação) - Limites de detecção efetivos* para CSIA de BTEX e álcoois, e técnicas de extração ou preparação de amostras de água. Adaptado de Hunkeler e colaboradores (2008) e Schmidt colaboradores (2004).

Composto	Técnica de extração / preparação	Mudança no valor de $\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^2\text{H}$ durante a análise	Definição do Limite de Detecção	Limite de Detecção operacional* ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Referência
				$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$	
Tolueno	SPME por imersão direta	nms ^e	Amplitude > 0,5 V	9	–	(ZWANK <i>et al.</i> , 2003)
	P&T	nms ^e	Amplitude > 0,5 V	0,25	–	(ZWANK <i>et al.</i> , 2003)
	P&T	nms ^e	Média dentro do intervalo $\pm 0,5 \text{ ‰}$ e $\delta < 0,5 \text{ ‰}$	0,07	–	(JOCHMANN <i>et al.</i> , 2006)
Hexanol	SPME por imersão direta	< 0,5 ‰	Amplitude > 0,75 V	4200	–	(DIAS e FREEMAN, 1997)
Álcool terc butílico	SPME por imersão direta	Mudança significativa (-1,18 \pm 0,12 ‰)	Precisão < 0,5 ‰	360	–	(HUNKELER <i>et al.</i> , 2001)
	P&T	n.r. ^d	Média dentro do intervalo $\pm 0,5 \text{ ‰}$ e $\delta < 0,5 \text{ ‰}$	25	–	(KUDER <i>et al.</i> , 2005)

* limites operacionais, baseados no critério de 1 nmol de C e 8 nmol de H; **a)** Analito dissolvido em solvente; **b)** Injeção *on column*; **c)** Injeção *splitless*; **d)** Não relatado na referência; **e)** Nenhuma mudança significativa (<0.5 ‰) observada.

De acordo com Palau e colaboradores (2007) e Górecki e colaboradores (1999), no caso do HS-SPME, a melhor alternativa de fibra é a Carboxen-PDMS. No entanto, ao contrário do PDMS (polidimetilsiloxano), esta fibra não segue a isoterma de Langmuir, porque a adsorção não é o único mecanismo atuante. Na Carboxen-PDMS ocorre também a condensação dos analitos no interior dos microporos, conferindo a este revestimento uma capacidade extra de concentração, embora seja necessário um tempo maior de extração para atingir o equilíbrio. Uma desvantagem na utilização desta fibra é a baixa linearidade observada na curva de calibração, em comparação com fibras baseadas em adsorção, como a de PDMS. Esta baixa linearidade é causada pelo limitado número de sítios de adsorção do revestimento e pela competição entre os analitos.

2.6. Análise de amostras contendo mistura complexa não resolvida

A técnica de CSIA pode ser aplicada no estudo de n-alcanos para diferenciação de petróleos e derivados (SUN *et al.*, 2003). No entanto, a análise pode tornar-se inviável na presença de mistura complexa não resolvida (MCNR), como ocorre no caso do óleo diesel, uma vez que a técnica é altamente dependente da resolução dos picos cromatográficos. Portanto nestes casos é necessário empregar uma técnica de purificação do extrato que elimine a MCNR.

Para isolar e concentrar esta classe de hidrocarbonetos, sem perda de qualidade analítica dos compostos minoritários e sem risco de ocorrência de fracionamento isotópico no processo de separação, é muito comum o uso de peneiras moleculares (GRICE *et al.*, 2008). Estas são sólidos naturais ou sintéticos que apresentam estrutura cristalina microporosa ($< 20 \text{ \AA}$), cujas dimensões de poro para uma determinada aplicação são fixadas de forma que apenas espécies com uma faixa específica de tamanho possam atravessá-la. O termo peneira molecular inclui zeólitas (naturais e sintéticas) e outros compostos microporosos tais como borosilicatos, aluminofosfatos e peneiras moleculares de carbono (CMS), como a *carbosphere* (KARLSSON, 2004).

As peneiras mais comumente utilizadas para a separação entre n-alcanos e iso-alcanos em petróleo são as de 5 \AA e ZSM-5 (silicalito), pois a estrutura de 5 \AA permite adsorção seletiva dos n-alcanos oriundos de frações de hidrocarbonetos saturados (GRICE *et al.*, 2008). Uma vez que as peneiras moleculares aprisionam os n-alcanos, deixando livres os demais

hidrocarbonetos, a recuperação destes é feita tradicionalmente com dissolução com mistura de ácido fluorídrico (HF) (TOLOSA e OGRINC, 2007) e solventes orgânicos, ou mais recentemente em refluxo com n-hexano (GRICE *et al.*, 2008). Alternativamente é possível obter adutos de n-alcanos com clatratos de uréia, que é um método de menor risco por não necessitar do uso de HF; no entanto, os hidrocarbonetos de menor peso molecular são normalmente perdidos no subsequente processo de evaporação (YAMADA *et al.*, 1994; GRICE *et al.*, 2008). Um exemplo da eficiência deste tipo de fracionamento é apresentado na Figura 4.

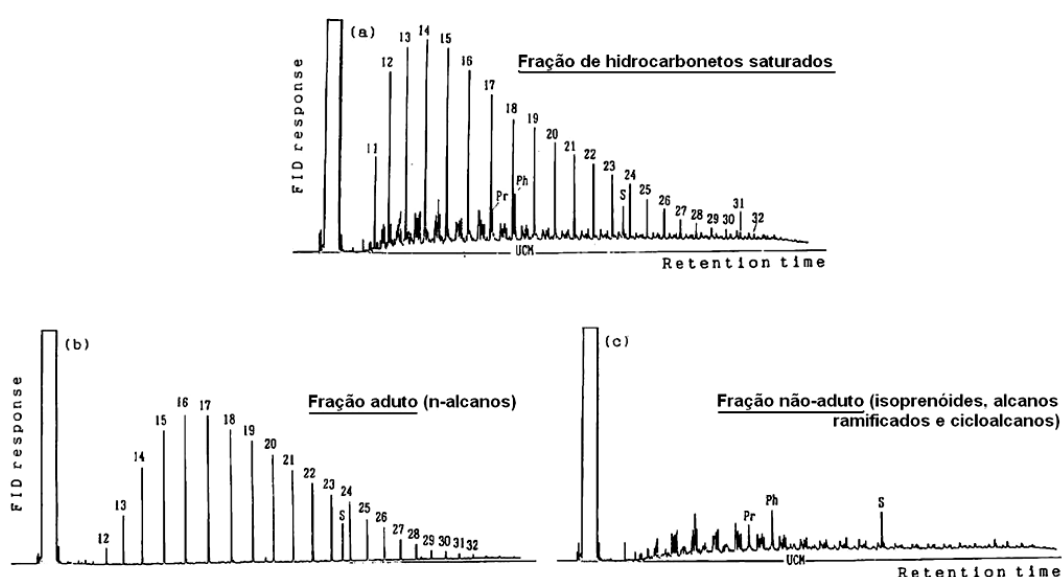


Figura 4. Cromatogramas de frações de petróleo separadas por peneira molecular. Números, Pr, Ph e S representam, respectivamente, os números de átomos de carbono de cada pico de n-alcano, os isoprenóides pristano e fitano, e padrão interno (C₂₄D₅₀). UCM representa a mistura complexa não resolvida. Adaptado de Yamada *et al.* (1994).

2.7. Combustíveis fósseis - gasolina

No Brasil a produção de gasolina é realizada quase que exclusivamente em refinarias da Petrobras, sendo posteriormente vendida para os diversos distribuidores de outras empresas. Atualmente, existem refinarias particulares em atividade no Brasil (TORRES, 1997), a importação de gasolina foi liberada pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) por meio da Portaria 314/2001, e três centrais petroquímicas (Petroquímica União -

PqU, em São Paulo; Braskem, em Camaçari/SP, Copesul em Triunfo/RS) foram autorizadas pela ANP a utilizar parte da nafta e correntes ricas neste insumo para a fabricação de gasolina. Mesmo com uma participação minoritária de outras empresas no mercado, isso pode ser o indicativo de uma mudança de cenário. Além disso, em longo prazo, as outras indústrias de petróleo em atuação no Brasil também tenderão naturalmente a entrar neste ramo de produção.

A gasolina que sai da refinaria pura é denominada gasolina “A”, e nas distribuidoras ocorre a adição de etanol anidro (25 %) e outros aditivos, que variam e acordo com a bandeira da distribuidora, para compor a chamada gasolina “C” e é comercializada nos postos de abastecimento. Atualmente 12 refinarias em operação no Brasil produzem gasolina.

O fracionamento do petróleo nas refinarias envolve diversos processos, com variações nos níveis de complexidade. A produção da gasolina é realizada normalmente a partir da nafta produzida por destilação atmosférica, e/ou por destilação a vácuo de frações pesadas que depois são enviadas para uma unidade de craqueamento catalítico em leito fluidizado (FCC – Fluid Catalytic Cracking) ou conforme esquematizado na Figura 5. A destilação atmosférica do petróleo, também chamada de destilação direta, promove a separação dos derivados leves e médios existentes no petróleo. Já a destilação a vácuo produz cortes de gasóleos que alimentam o processo de FCC, no qual duas correntes nobres são geradas: o GLP e a gasolina, sendo esta de qualidade intrínseca (octanagem) superior à obtida na destilação direta. O uso de coqueamento, que é uma forma mais severa de craqueamento térmico, dependerá da configuração da refinaria (ANP, 2009). Portanto, a composição isotópica de uma determinada gasolina pode ser influenciada por diversas variáveis envolvidas no processo, tais como:

- A carga, ou seja, o petróleo ou mistura de petróleos que entra na refinaria;
- O tipo de unidade de FCC;
- O catalisador de FCC;
- As correntes internas da refinaria que são combinadas para gerar o produto final.

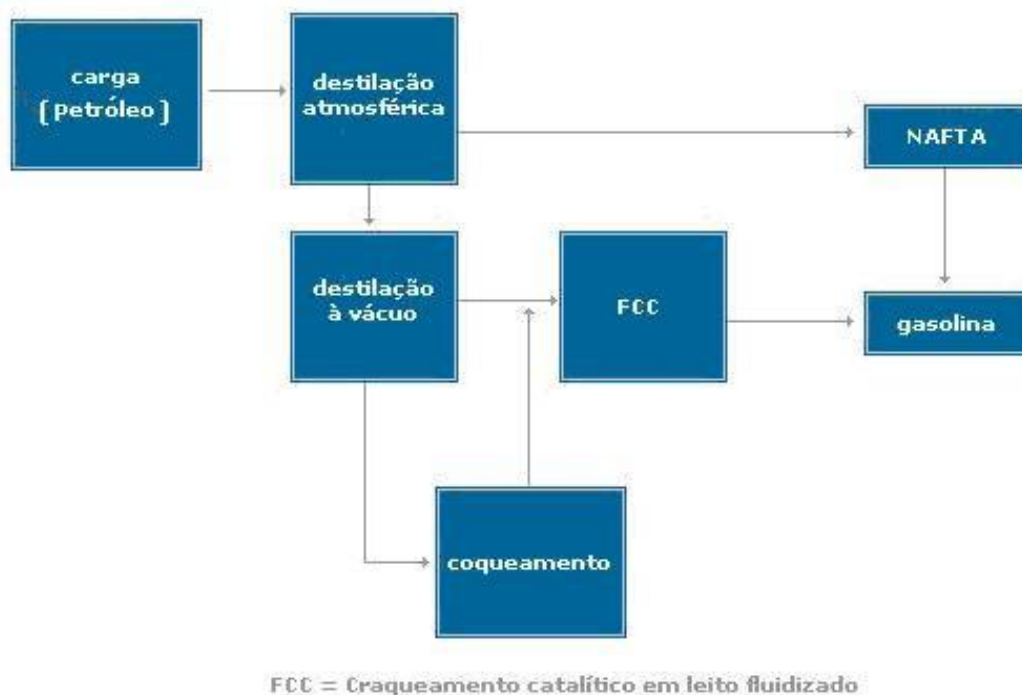


Figura 5. Esquema simplificado do refino do petróleo para produção de gasolina.

A carga que entra na refinaria pode variar em função de uma série de fatores tais como a proximidade do poço produtor; a necessidade de mercado, que pode demandar até mesmo a importação de petróleo; a necessidade de adequação dos produtos, que pode levar a uma composição de cargas diferente da habitual. Paradas da refinaria podem também levar à produção por cabotagem, que consiste no recebimento deste produto pronto oriundo de outra refinaria. Numa primeira etapa do refino, a carga é submetida a uma torre de destilação atmosférica onde são produzidas diversas correntes, entre elas o gasóleo, que posteriormente é direcionado para uma unidade de craqueamento catalítico.

O craqueamento catalítico é o processo no qual o gasóleo, proveniente do processo de destilação, entra em contato com o leito de catalisador sob condições severas de temperatura, que podem variar de 500 a 700 °C, para a quebra das moléculas em várias frações mais leves, como gás combustível, gás liquefeito de petróleo, olefinas, gasolina e óleos leves e decantado. Com relação a suas principais aplicações, os catalisadores de FCC comerciais podem ser classificados em três grandes categorias: (1) catalisadores FCC de gasolina, usado para maximizar o rendimento (2) catalisadores FCC de octanagem,

usados para maximizar a octanagem ou barris-octano (produto entre rendimento de gasolina e número de octano), e (3) catalisadores FCC de resíduo, usados para quebrar a carga residual (SCHERZER, 1993). A Figura 6 mostra a composição de um catalisador de FCC.

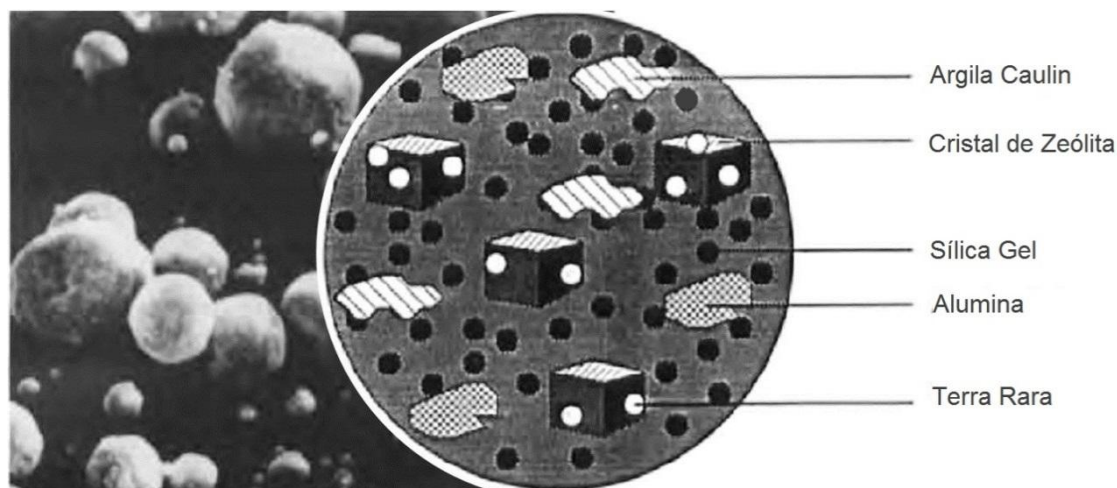


Figura 6. Catalisador de FCC. Adaptada de Avidan (1993).

No processo de craqueamento catalítico, os hidrocarbonetos aromáticos leves são produzidos por duas rotas principais, quais sejam: 1) desalquilação de alquil-aromáticos de cadeia longa, e 2) ciclização de compostos da faixa da gasolina seguida de transferência de hidrogênio (MOTA E RAWET, 1995), representados na Figura 7. Destes, o mecanismo de desalquilação é mais importante em baixas taxas de conversão, enquanto o outro processo predomina com o aumento da conversão, devido à crescente concentração de olefinas e parafinas (MOTA E RAWET, 1995; ZHAO *et al.*, 1996; VAN KLINK *et al.*, 1990).

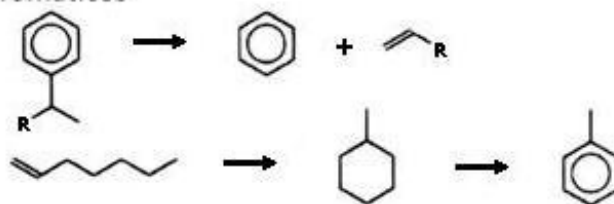
ZHAO e colaboradores (1996) investigaram o efeito da composição do catalisador de FCC, carga e condições operacionais na geração de para-xileno em uma unidade piloto, testando desde gasóleos até resíduos pesados. Como resultado, foi constatado que:

- Apesar da natureza refratária, a carga pesada e aromática (42,1 % aromáticos) gera cerca de 20 % mais p-xileno do que a carga pesada parafínica (24,3 % aromáticos), mesmo havendo algum consumo do composto original no processo de FCC;
- Independente da sua composição, o aumento do teor de zeólita aumenta o rendimento de p-xileno;

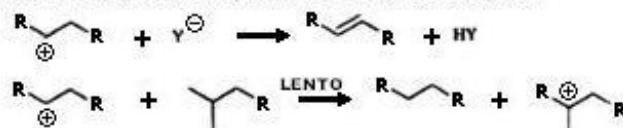
- Redução da atividade da matriz, aumento no teor de terras raras e aumento da temperatura do reator também elevam o rendimento de p-xilenos;
- A concentração de benzeno cresce quase que linearmente às concentrações de tolueno e xileno na gasolina, provavelmente devido à compensação entre os mecanismos de craqueamento α que favorece a formação de xilenos e tolueno em comparação à ciclização e desidrogenação, favorecendo a formação de benzeno;
- A temperatura não altera significativamente a distribuição termodinâmica entre os isômeros orto-, meta- e para-, que permanecem em torno de 0,3:0,5:0,2 independentemente de diferenças entre catalisadores, cargas ou condições operacionais.

Este conjunto de informações sugere que cada refinaria, com sua especificidade de cargas, unidades de FCC e catalisadores, poderia gerar uma gasolina isotopicamente diferente das demais.

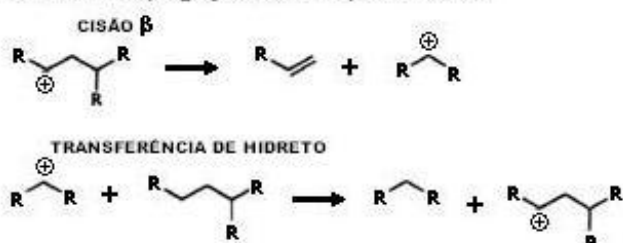
Esquema 1. Mecanismos esquemáticos de formação de aromáticos



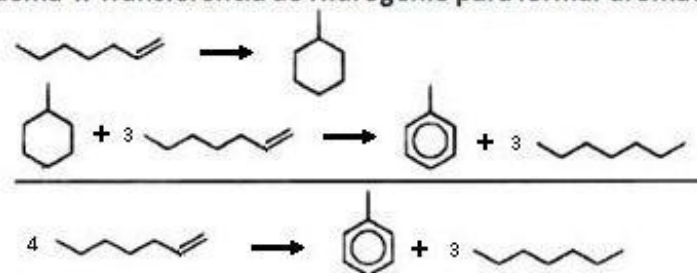
Esquema 2. Baixa conversão química de íons carbênio: desprotonação versus transferência de hidreto



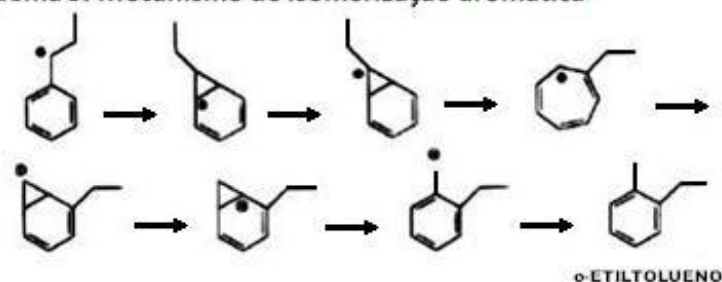
Esquema 3. Propagação do craqueamento



Esquema 4. Transferência de Hidrogênio para formar aromáticos



Esquema 5. Mecanismo de isomerização aromática



o-ETILTOLUENO

Figura 7. Mecanismos de formação dos BTEX no processo de FCC.
Adaptado de Mota e Rawet (1995).

SMALLWOOD e colaboradores (2002) estudaram 19 amostras de gasolina, coletadas em postos de abastecimento e refinarias de diferentes áreas dos Estados Unidos e avaliaram as diferenças nas razões isotópica de carbono e a extensão do fracionamento isotópico de carbono após experimentos de evaporação e da simples lavagem com água. Foi constatada uma ampla faixa de valores de $\delta^{13}\text{C}$ para vários dos compostos identificados, com destaque para 2-metilpentano (-33,98 a -25,53 ‰), n-hexano, -29,02 a -22,76 ‰), benzeno (-30,05 a -24,71 ‰) e etilbenzeno, (-29,27 a -23,36 ‰), reforçando o potencial do uso de CSIA na diferenciação de fontes deste combustível.

O estudo do efeito da evaporação durante uma semana nestas mesmas amostras revelou que os valores de naftaleno, metil-naftaleno permaneceram isotopicamente consistentes por todo o período do experimento, indicando preliminarmente a utilidade destes compostos na comparação de amostras altamente evaporadas com suas possíveis fontes. As mesmas amostras foram agitadas com água e deixadas descansar por uma semana, simulando o comportamento da gasolina na água subterrânea, e apenas alguns compostos apresentaram fracionamento acima de 1 ‰, na análise do headspace. Este fracionamento foi atribuído como sendo um possível resultado da solubilidade preferencial do isótopo mais leve na água, ou da biodegradação das amostras de gasolina. Estes resultados indicaram que a maioria dos compostos na gasolina não sofre fracionamento isotópico de carbono significativo como resultado dos processos de evaporação e dispersão em água.

No caso do fracionamento do deutério em processos de evaporação, este fenômeno mostra-se mais acentuado do que o de carbono 13. A redução na razão isotópica $\delta^2\text{H}$ dos BTEX e n-alcanos leves (n-C10 a n-C14) devido à evaporação foi demonstrada como bastante significativa por (Wang e Huang, 2003) embora não seja importante para $\delta^{13}\text{C}$, conforme demonstrado anteriormente por Smallwood e colaboradores (2002). No entanto, em estudos envolvendo contaminação do lençol freático com derivados de petróleo, é preciso levar em conta os processos de difusão e biodegradação, e como estes interferem nas razões isotópicas avaliadas, pois ambos levam ao fracionamento isotópico de compostos monoaromáticos, n-alcanos e ciclo-alcanos de cadeia curta (BOUCHARD *et al.*, 2005).

2.8. Biocombustível – etanol

O etanol no Brasil é produzido através de fermentação de cana de açúcar, uma planta do grupo botânico C4, (família Gramineae e género *Saccharum*), que tem uma grande importância económica, uma vez que também produz açúcar. Nativa aos climas tropicais, esta planta é cultivada em regiões com solos férteis e bem drenados (CESNIK e MIOCQUE, 2004), crescendo em condições ambientais diferentes, e mesmo adversas, devido ao desenvolvimento de diversas variedades aprimoradas para dar a melhor resposta e permitir que a colheita se estenda por grande parte do ano (BARBOSA *et al.*, 2012). A estrutura biomassa típica da cana é composta por água, fibra e açúcar (BNDES, 2014).

A produção do etanol depende da colheita da safra, e atualmente devido ao uso de retardadores ou aceleradores de maturação pode durar praticamente o ano todo. A colheita inicia-se em maio ou abril, prolongando-se até novembro, período em que a planta atinge maturação plena (máximo teor de sacarose, possibilitando uma colheita mais lucrativa) e inicia-se o período chuvoso. A época exata da colheita depende da variedade da cana cultivada, que por sua vez é dividida em três categorias: as de ciclo precoce, médio e tardio (Tabela 6). Atualmente existem mais de 80 variedades disponíveis aos produtores, sendo que nenhuma delas ocupa mais de 10 % da área cultivada (SEGATO *et al.*, 2006).

Tabela 6. Informações sobre a safra da cana-de-açúcar (SEGATO *et al.*, 2006)

Safra	Categoria	PUI ^(a) (dias)	Colheita
Outono	Precoce	Curto (70-110)	Mai-Jun
Inverno	Média	Médio (110-150)	Jul-Ago
Primavera	Tardia	Longo (> 150)	Set-Nov

(a) PUI: período de utilização industrial da safra de cana-de-açúcar

Existem duas regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil, diferenciadas pelo período da safra, que são a região Norte-Nordeste e a região Centro-Sul (Quadro 1 e Tabela 7). A região Centro-Sul, principal produtora, na safra 2006/07 foi responsável por 87,5 % da produção nacional de cana-de-

açúcar, por 85,5 % da produção de açúcar e 90,5 % da produção de etanol. São Paulo, o maior estado produtor, foi responsável por 63 % de toda a cana produzida no Brasil, por 63,3 % da produção nacional de álcool e por 65 % da produção de açúcar (MORAES, 2007). A Figura 8 apresenta a vista panorâmica de uma usina de produção de açúcar e etanol em São Paulo.

Quadro 1. Regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil (MORAES, 2007)

Regiões produtoras de cana-de-açúcar	Norte-Nordeste	Centro-Sul
Estados representativos	Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Tocantins	São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio de Janeiro, Espírito Santo
Participação na produção de etanol (safra 2006/2007)	9,5 %	90,5 %

Tabela 7. Maiores estados produtores de etanol em 2011 (BARBOSA *et al.*, 2012)

Região	Principais produtores	Produção (%)
Sudeste	São Paulo	54,4
	Minas Gerais	8,9
Nordeste	Alagoas	4,9
	Pernambuco	3,1
Centro-Oeste	Goiás	8,1
	Mato Grosso do Sul	6,0
Sul	Paraná	7,2



Figura 8. Vista panorâmica da planta de produção da Agropecuária Jayoro, localizada em Presidente Figueiredo (AM). À esquerda as facilidades de destilação de etanol, e à direita a recepção da safra de cana, imediatamente seguido pelo processo de moagem. Foto tirada pelo autor.

A literatura apresenta vários trabalhos relatando o uso de razões isotópicas de carbono, hidrogênio e oxigênio para a análise de produtos naturais e suas diversas matérias primas. Com relação ao etanol, a grande maioria destes trabalhos envolve a discriminação da origem ou adulteração de bebidas, embora alguns discutam também a determinação geográfica da matéria prima.

Dentre estes se destaca o trabalho de Ishida-Fujii e colaboradores (2005) que conseguiram não só diferenciar claramente etanol produzido a partir de plantas C3 e C4, como também identificar sua origem botânica, além de identificar o etanol sintético, através de razões de carbono e oxigênio (Figura 9). O estudo envolveu a análise de 27 amostras de etanol fermentado de milho, cana-de-açúcar, trigo e tapioca, todas de origens conhecidas. Especificamente com relação à cana-de-açúcar, foram analisadas 11 amostras dos países Brasil (3), Japão (1), Paquistão (4), Índia (2) e Bolívia (1), para as quais a razões isotópicas variaram entre $\delta^{13}\text{C} = -12,81 \pm 0,51 \text{ ‰}$ e $\delta^{18}\text{O} = -12,65 \pm 4,14 \text{ ‰}$.

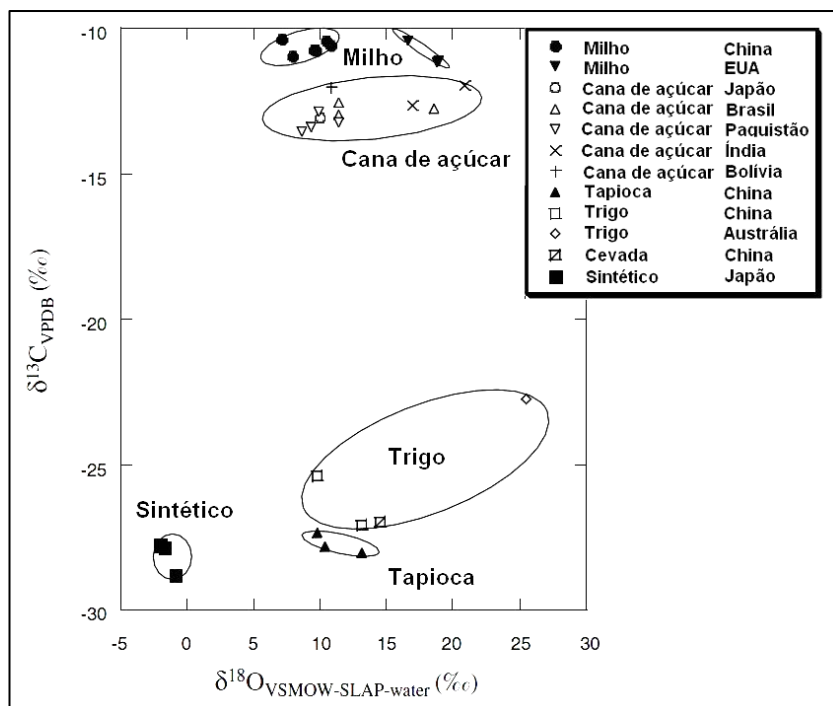


Figura 9. Análises combinadas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ em amostras de álcool retificado com origens conhecidas (Adaptado de ISHIDA-FUJII *et al.* 2005).

O mesmo trabalho mostra também a viabilidade de diferenciar, através de razões de D e ^{18}O , duas regiões de cultivo da mesma espécie botânica (Figura 10).

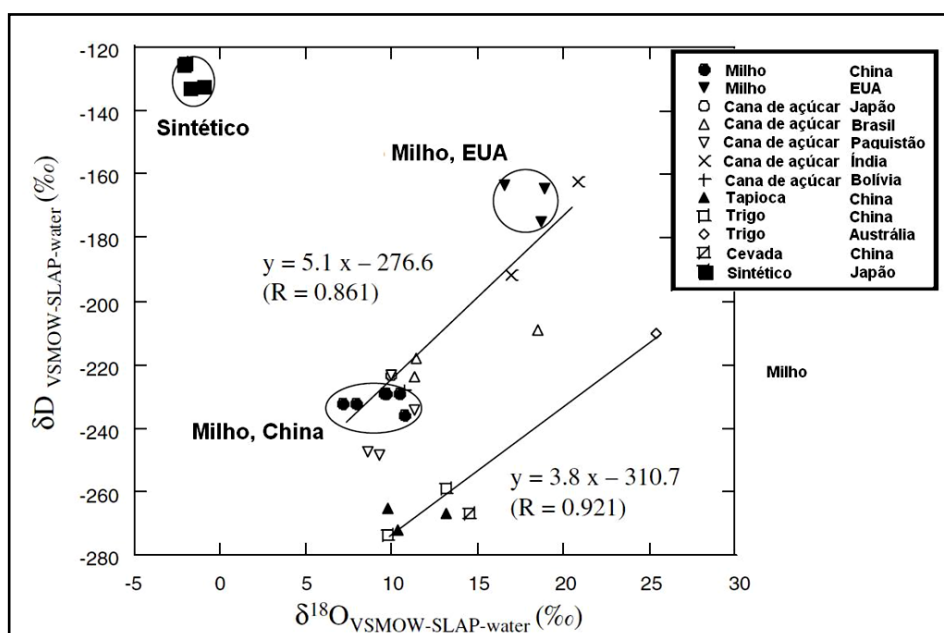


Figura 10. Diferenciação de origem geográfica de etanol de milho (Adaptado de ISHIDA-FUJII *et al.*, 2005).

Em outra publicação recente (ADAMI *et al.*, 2010) a determinação tanto das razões de carbono do etanol quanto de oxigênio da água presentes no vinho foram combinadas, visando caracterizar a origem geográfica de vinhos produzidos nas safras de 2005 e 2006, em condições de microvinificação, para três regiões do sul do Brasil (Figura 11).

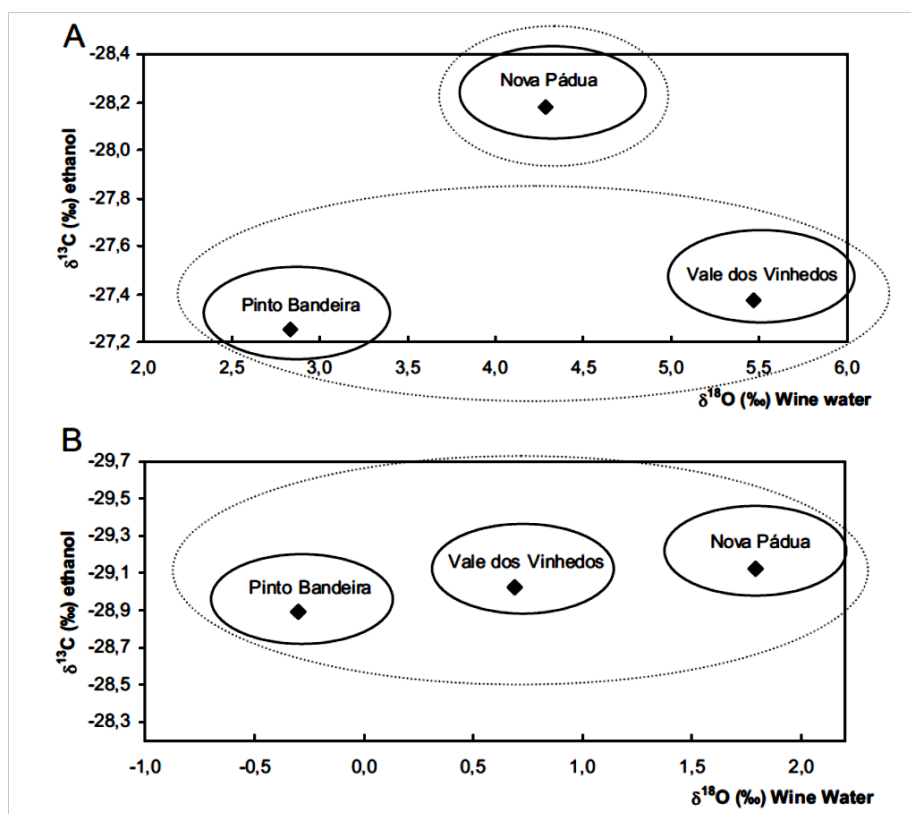


Figura 11. Caracterização da origem geográfica de vinhos produzidos em três regiões do sul do Brasil. A) safra de 2005; B) safra de 2006 (ADAMI *et al.*, 2010).

Abordando outro foco para o uso desta ferramenta analítica, Pissinatto e colaboradores (1999), partindo do fato de que o etanol obtido da fermentação da cana-de-açúcar (planta C4) e da uva (planta C3) apresentam composições isotópicas de carbono totalmente distintas, conseguiram evidenciar a adulteração de brandies produzidos no Brasil por meio da avaliação das composições isotópicas totais de carbono. Foram comparadas 62 amostras de destilado de uva (*brandy*) e seu similar de baixo custo, destilado de cana-de-açúcar (conhaque de gengibre), sendo 23 brandies brasileiros, 11 europeus e 28 conhaques de gengibre brasileiros (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados da comparação de $\delta^{13}\text{C}$ de etanol de bebidas destiladas brasileiras e europeias, evidenciando mistura de etanol de uva e de cana nas marcas nacionais de brandy e uso unicamente de etanol de cana no conhaque de gengibre. O brandy europeu foi produzido unicamente com de etanol de uva. (PISSINATTO *et al.*, 1999)

Produto estudado (no. de amostras)	$\delta^{13}\text{C}$		
	média	mínimo	máximo
Brandy europeu (11)	-27,5	-29,6	-26,3
Brandy nacional (23)	-18,0	-22,9	-16,0
Conhaque de gengibre (28)	-12,9	-14,8	-11,1

Os resultados obtidos evidenciaram que, dentre as marcas nacionais de brandy, todos apresentaram em sua composição mistura de etanol de uvas e de cana (24-76 % de uva) que, segundo especulam os autores, pode estar associado à redução de custo da produção, uma vez que os preços aumentam proporcionalmente ao percentual de etanol de uva. Foi constatado também que o conhaque de gengibre é fabricado unicamente de etanol de cana e que o brandy europeu é produzido unicamente de etanol de uva (PISSINATTO *et al.*, 1999).

2.9. Influência do ciclo hidrológico na produção do etanol

A cultura da cana-de-açúcar, matéria prima na produção de etanol, requer grande quantidade de água, que representa 70% do seu peso e é absorvida principalmente pelas raízes (CESNIK e MIOCQUE, 2004). A água do solo está intimamente ligada à água da planta e também a água de chuva. A chuva se infiltra na subsuperfície do solo onde é retida para reconstruir a umidade e recarregar o lençol freático. Etanol é formado durante a fermentação dos açúcares, e, neste processo, tanto o açúcar quanto o meio aquoso contribuem como fontes de hidrogênio (MARTN *et al.*, 1982; MARTIN *et al.*, 1983; MARTIN *et al.*, 1986; SAUR *et al.*, 1968a; SAUR *et al.*, 1968b; PIONNIER *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 1995), enquanto a água da planta e o açúcar são as fontes de

oxigênio (SCHMIDT *et al.*, 2001) Os átomos de hidrogênio no grupo metileno do etanol deriva da água presente no meio fermentativo, composto basicamente de água da planta, de modo que a diferenciação de fontes de etanol envolve o entendimento do ciclo da água e das suas interações no ecossistema. Em termos de razões isotópicas de carbono, o etanol deve refletir a composição isotópica do açúcar original, uma vez que a fermentação não causa fracionamento (HOBIE e WERNER, 2004).

As razões isotópicas de oxigênio e hidrogênio na água são marcadores importantes em estudos hidrogeológicos, uma vez que mudanças de fase, como a evaporação e a condensação (precipitação), determinam o enriquecimento ou empobrecimento do isótopo mais pesado em um reservatório. Embora gradientes na composição isotópica da água presente no solo possam surgir de diferenças nos aportes sazonais de umidade, da evaporação na camada mais superficial, bem como das diferenças entre a umidade do solo e a água subterrânea, não há fracionamento isotópico durante a absorção de água pelas raízes e o transporte para as folhas (EHLERINGER *et al.*, 2000; ALLISON *et al.*, 1983; CLARK e FRITZ, 1997). A avaliação isotópica fornece, portanto, informações sobre a fonte de água (irrigação, água de chuva, água subterrânea, e outros) e uso pelas plantas.

A composição isotópica de oxigênio, hidrogênio e também de carbono no etanol já foi usada para: diferenciação de origens botânicas e geográficas (MARTN *et al.*, 1982; ADAMI *et al.*, 2010; DUTRA *et al.*, 2011; FARQUHAR, *et al.*, 1989; ISHIDA-FUJII *et al.*, 2005; O'LEARY, 1981), avaliação de assinatura isotópica em locais contaminados (FREITAS *et al.*, 2010) a avaliação de fontes de etanol na atmosfera (GIEBEL *et al.*, 2011) e investigação da adulteração de bebidas alcoólicas (MONSALLIER-BITEA *et al.*, 2006; AGUILAR-CISNEROS *et al.*, 2002; GILBERT *et al.*, 2013; PISSINATTO *et al.*, 1999). No entanto, apesar da produção de etanol difundida em todo o Brasil, em locais com propriedades climáticas diversas, nenhuma avaliação integrada foi reportada a respeito do impacto das condições regionais, incluindo o ciclo hidrológico, sobre as razões isotópicas no etanol.

2.10. Hipóteses

O potencial do uso de razões isotópicas de C, H e O para diferenciação de fontes de combustíveis fósseis e biocombustíveis será avaliado neste trabalho, e para tal, foram levantadas hipóteses que estão descritas a seguir.

Hipóteses para Gasolina

1) O processo de refino promove alterações na composição isotópica de Carbono e Hidrogênio dos hidrocarbonetos leves presentes na gasolina em relação ao petróleo original.

2) A diversidade dos processos de refino utilizados causa fracionamentos isotópicos característicos, imprimindo razões isotópicas únicas na gasolina produzida em diferentes refinarias.

3) A razão isotópica gerada pelo refino do petróleo pode ser utilizada para correlacionar amostras de fase livre ou de água contaminada com gasolina coletada no meio ambiente com as respectivas refinarias produtoras.

Hipóteses para o Etanol

1) As razões isotópicas de carbono e hidrogênio do etanol variam regionalmente;

2) Fatores regionais diversos como clima, precipitação, tipo de solo, etc, imprimem razões isotópicas para etanol características da região produtora.

3

Área de estudo e amostragem para a gasolina

3.1. Área de estudo para a gasolina

As amostras de gasolina A foram coletadas em 12 refinarias de petróleo distribuídas em oito estados do Brasil, representando suas especificidades, uma vez que apresentam diferentes variáveis de processo na produção de gasolina (carga, unidade FCC, catalisadores, etc.). Para este estudo, as refinarias receberam nomenclaturas alfa-numéricas de R01 a R12.

3.2. Amostragem de gasolina

As amostras de gasolina foram coletadas entre 2011 e 2012, diretamente dos tanques de armazenamento de produto para venda, sendo armazenadas em frascos de vidro de 40 mL específico para análise de voláteis, que permaneceram refrigerados a 4 °C até o momento da análise. Para viabilizar uma avaliação temporal das razões isotópicas de C e H no BTEX da gasolina destas refinarias, pelo menos duas campanhas de amostragem foram realizadas por unidade, como nos casos das refinarias R04, R07, R08, R09, R10 e R12. Nas refinarias R02, R03 e R05 foram realizadas três campanhas ao longo do estudo, enquanto para a refinaria R06 foram realizadas quatro. Excepcionalmente para a refinaria R01 foram coletadas doze amostras ao longo de 1 ano.

4

Metodologia para a gasolina

4.1. Equipamentos e materiais

A otimização das condições analíticas foi realizada em um cromatógrafo TraceGC Ultra, com injetor *split/splitless* e detetor por ionização em chama de hidrogênio (GC-FID), fornecido pela Thermo Scientific. A seleção da coluna cromatográfica e da rampa de temperatura foi realizada com base na avaliação das colunas DB-VRX (60 m; 0,25 mm ID; 1,40 μm , *part number* 122-1564) e a DB 624 (30 m; 0,32 mm ID; 1,8 μm ; *part number* 123-1334), ambas fornecidas pela Agilent J&W. Nos testes foi utilizada uma amostra de gasolina A fornecida pela refinaria R05, injetando-se sempre 1,0 μL com *split* variando de 200 a 250 (*split* máximo permitido pelo equipamento para o fluxo de gás de arraste utilizado). Os tempos de retenção dos BTEX foram determinados com a injeção de padrão BTEX 2,0 mg mL⁻¹ fornecido pela *Chem Service* (Pensilvania, EUA). Nos testes com SPME foram utilizadas fibras de PDMS 100 μm e Caroxen-PDMS 85 μm , placa de agitação modelo 702 fornecida pela Fisatom (São Paulo, Brasil) e NaCl fornecido pela Merk.

As determinações das razões ¹³C/¹²C e ²H/¹H dos BTEX foram feitas em um CF-IRMS Deltaplus V (ThermoFinnigan, Bremen, Alemanha) dotado de dispositivo *open split*, conectado em linha via sistema Conflo 4 de gerenciamento de fluxos com ambos um analisador elementar Flash EA 1112 (ThermoQuest, Milão, Itália) e um cromatógrafo a gás Trace GC Ultra tendo como interface fornos de combustão/redução Isolink (Thermo Electron S.p.A, Milão, Itália). O cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar HP DB-624 (30 m x 0,32 mm ID, 1,8 μm) e as condições analíticas estão apresentadas no Quadro 2. A introdução das amostras no sistema analítico foi realizada por meio de um autoamostrador CombiPal (CTC Analytics, Zwingen, Suíça) dotado de injetor de líquido e acessórios para *Headspace* estático e SPME.

Quadro 2. Condições do sistema analítico**Condições cromatográficas CG-Isolink**

Temperatura do injetor: 250°C;

Modo de injeção

- com divisão (*split*) para análise de $\delta^{13}\text{C}$ (razão 100:1;
Fluxo 150 mL min⁻¹)
- sem divisão (*splitless*) para análise de $\delta^2\text{H}$

Coluna Agilent J&W DB 624 (30 m; 0,32 mm ID; 1,8 μm)

Gás carreador da coluna: 1,5 mL min⁻¹ (fluxo constante);

Volume de injeção: 2 μL .

Programa de temperatura do forno: 45 °C (10 min), rampa 1 (12 °C min⁻¹)
até 150 °C, rampa 2 (12 °C min⁻¹) até 240 °C (5 min).

Fornos Isolink ajustados em 1000°C ($\delta^{13}\text{C}$) e 1450°C ($\delta^2\text{H}$).

Condições do Headspace (Combipal)

- Temperatura da seringa: 50 °C;
- Temperatura de incubação: 50 °C;
- Tempo de incubação: 5 min;
- Velocidade de agitação: 500 rpm
- Seringa de 1 mL tipo *gas tight*
- Volume de injeção: 500 μL

Condições do SPME (Combipal)

- Velocidade de Agitação: 400 rpm
- Tempo de exposição da fibra: 5 min
- Tempo de dessorção: 11 min (1 min de dessorção e 10 de
recondicionamento)
- Fibras de PDMS 100 μm e Carboxen/PDMS 75 μm

Quadro 2 (Continuação) – condições do sistema analítico

Condições dos reatores no Analisador Elementar Flash

Reator de combustão (até CO₂) em temperatura de 1020 °C, preparado com tubo de quartzo preenchido com óxido de cromo (50 mm); cobre reduzido (110 mm); óxido cobaltoso/cobáltico (30 mm) e lã de quartzo (10 mm) no topo, fundo e entre camadas de reagentes.

Reator de conversão térmica (em H₂) em temperatura de 1450 °C, preparado com tubo cerâmico contendo tubo reator de carvão vítreo (270 mm), cadinho de grafite, carbono vítreo granulado (100 mm); lã de vidro (5 mm); carbono vítreo granulado (15 mm), lã de quartzo (15 mm) e lã de prata (5 mm).

Padrões puros de Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e m-Xileno foram usados como padrões de trabalho na análise por CF-IRMS, após determinação de suas razões isotópicas, como será apresentado neste capítulo. Estes foram diluídos em isooctano grau análise de resíduos nas condições cromatográficas descritas no Quadro 2 para avaliar o desempenho do sistema analítico a cada 20 injeções de amostras.

Os padrões internacionais usados para análise elementar foram os materiais de referência USGS 40, L-Ácido Glutâmico ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB-LSVEC}} = -26,39 \pm 0,04 \text{ ‰}$) e IAEA-CH-7, Polietileno ($\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -100,3 \pm 2,0 \text{ ‰}$).

4.2. Otimização das condições analíticas no GC-FID

Numa primeira fase deste trabalho diversos parâmetros da análise cromatográfica, incluindo introdução da amostra, foram testados com objetivo de alcançar a melhor resposta possível e uma total resolução entre os picos de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, e os demais picos presentes nos cromatogramas, uma vez que a análise de CSIA só pode ser aplicada se houver resolução em nível de linha de base (HUNKELER *et al.*, 2008). A otimização das

condições analíticas para BTEX por GC-FID, utilizando SPME como sistema de preparação das amostras, envolveu quatro etapas:

- 1) Seleção da coluna cromatográfica, visando resolução dos BTEX em nível de linha base;
- 2) Avaliação do septo Merlin Microseal x septo padrão visando otimizar injeção por SPME;
- 3) Otimização da extração de BTEX por SPME em Headspace dinâmico.

1) Seleção da coluna cromatográfica, visando resolução dos BTEX em nível de linha base

A coluna DB-VRX foi testada utilizando as condições cromatográficas apresentadas na Tabela 9. Variou-se temperatura inicial, fluxo de gás de arraste e isotermas, no entanto, não foi possível obter a separação desejada utilizando-se esta coluna, devido à coeluição do benzeno com um pico desconhecido. Substituição por uma coluna DB-624, e novas avaliações (Tabela 10), resultaram em resolução adequada entre os BTEX e os demais picos. Portanto, para o desenvolvimento da metodologia foi selecionada a coluna DB-624, utilizando os parâmetros da Tabela 10, teste 11.

Tabela 9. Testes de avaliação da coluna DB-VRX para a análise de BTEX em gasolina

Teste	Programação de temperatura ^a	Fluxo de hélio (mL min ⁻¹)
01	45 °C (10 min), 12 °C/min → 190 °C (2 min), 6 °C/min → 225 °C (2 min), 12 °C/min → 240 °C (5 min)	2,0
02	45 °C (10 min), 12 °C/min → 190 °C (2 min), 6 °C/min → 225 °C (2 min), 12 °C/min → 240 °C (5 min)	2,5
03	40 °C (10 min), 12 °C/min → 190 °C (2 min), 6 °C/min → 225 °C (2 min), 12 °C/min → 240 °C (5 min)	1,5
04	40 °C (15 min), 10 °C/min → 190 °C (2 min), 12 °C/min → 240 °C (3 min)	1,5
05	40 °C (15 min), 5 °C/min → 190 °C (2 min), 12 °C/min → 240 °C (3 min)	1,5
06	40 °C (5 min), 5 °C/min → 120 °C (2 min), 12 °C/min → 200 °C (2 min), 20 °C/min → 240 °C (5 min)	2,0
07	37 °C (10 min), 12 °C/min → 190 °C (2 min), 6 °C/min → 225 °C (2 min), 12 °C/min → 240 °C (5 min)	1,3
08	36 °C (10 min), 12 °C/min → 190 °C (2 min), 6 °C/min → 225 °C (2 min), 12 °C/min → 240 °C (5 min)	2,0

a) Tempo em isotermas entre parênteses.

Tabela 10. Testes de avaliação da coluna DB-624 para a análise de BTEX em gasolina

Teste	Programação de temperatura ^a	Fluxo de hélio (mL min ⁻¹)
09	45 °C (10 min), 12 °C/min → 190 °C (2 min), 6 °C/min → 225 °C (2 min), 12 °C/min → 240 °C (5 min)	2,5
10	45 °C (10 min), 12 °C/min → 150 °C, 30 °C/min → 240 °C (5 min)	2,0
11	45 °C (10 min), 12 °C/min → 150 °C, 30 °C/min → 240 °C (5 min)	2,5

a) Tempo em Isotermas entre parênteses.

2) Avaliação do septo Merlin Microseal® x septo convencional

Com coluna e as condições cromatográficas definidas foram iniciados os testes de avaliação das duas opções de septo disponíveis: o septo convencional e o Merlin Microseal®, um septo mecânico que teria como principal vantagem eliminar a interferência do septo na corrida cromatográfica - visando a introdução de amostras através da técnica de SPME. Nos testes de dessorção no injetor, realizados em triplicata, os picos obtidos com septo convencional indicaram tendência a áreas maiores do que as obtidas via Merlin (Tabela 11). Uma explicação provável é que para instalação do Merlin, foi necessário utilizar um adaptador que elevou a altura do injetor em 1,5 cm, resultando em uma dessorção da fibra do SPME acima da região mais quente do *liner* e comprometendo este processo. A Figura 12 mostra a importância da posição da fibra durante a dessorção (BLESSING *et al.*, 2008). Portanto, optou-se pelo uso de septo convencional. Os testes foram realizados através da extração via SPME de 10 mL de solução de BTEX em água, na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 11. Comparação da eficiência da dessorção do SPME utilizando septo Merlin Microseal® e septo comum. Utilizaram-se triplicatas de solução aquosa de BTEX $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Resultados em picoAmperes (pA)

Composto	Média septo Merlin (pA, n=3)	Média septo Convencional (pA, n=3)
Benzeno	775.546	1.011.737
Tolueno	2.716.754	3.223.571
Etilbenzeno	7.881.037	9.077.821
<i>mp</i> -Xilenos	16.181.368	18.585.842
<i>o</i> -Xileno	7.308.986	8.239.197

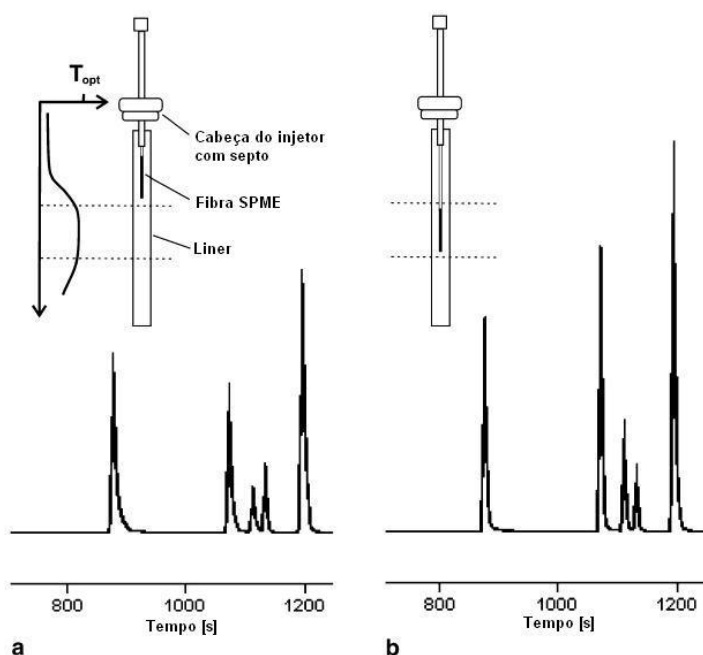


Figura 12. Influência da posição (altura) durante exposição da fibra de SPME para dessorção dos analitos dentro do *liner* do injetor: a) exposição da fibra acima da zona mais aquecida do injetor; b) exposição da fibra na região correta do injetor. Adaptado de Blessing *et al.* (2008).

3) Otimização da extração de BTEX por SPME em Headspace dinâmico

Para otimização a extração por SPME em headspace (HS) foi utilizada uma fibra de PDMS com 100 μ m de fase, placa de agitação em velocidade 3, tempo de 2 minutos de exposição da fibra e alíquotas de 10 mL de solução BTEX 20 μ g L⁻¹. Foram feitos testes com água pura e também adicionada de NaCl de 2,0 ou 3,0 gramas de NaCl (solubilidade 3,55 g/10 mL), visando avaliar a influência da técnica de salting out. Os resultados dos testes estão apresentados na Tabela 12 e Figura 13 e mostram o aumento da eficiência da extração com a adição de 3 gramas de sal.

Tabela 12. Otimização da extração de BTEX por HS-SPME em fibra de PDMS 100 μ m. Méida das áreas (n=3) obtidas em picoAmperes (pA)

Composto	Sem NaCl	Adição de 2 g NaCl	Adição de 3 g NaCl
Benzeno	1.011.737	2.676.885	3.472.234
Tolueno	3.223.571	9.360.786	12.204.157
Etilbenzeno	90.77.821	24.903.692	31.090.850
m,p-Xilenos	18.585.842	53.151.666	66.976.314
o-Xileno	8.239.197	26.383.730	35.074.486

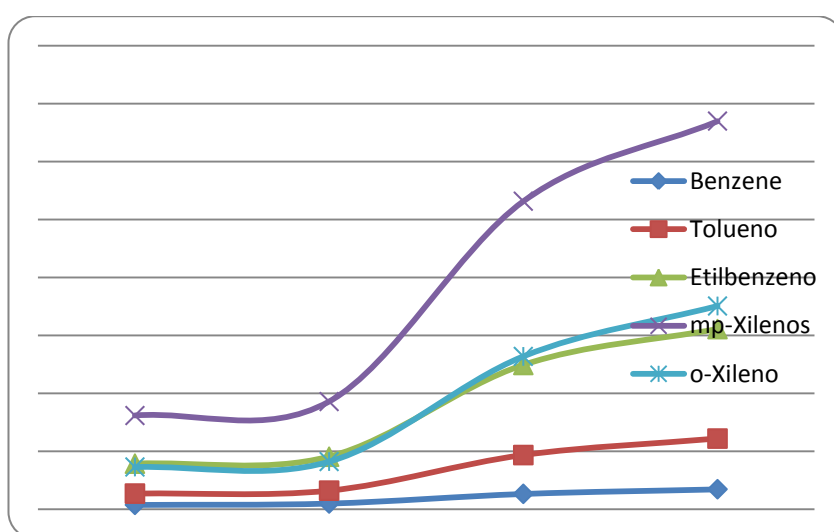


Figura 13. Variação das áreas dos picos dos BTEX em função do tipo de septo e do efeito *salting out* com NaCl.

Foi testado também o impacto de não agitar a amostra durante a exposição da fibra sobre a área dos picos, uma vez que o autoamostrador CombiPal permite somente a exposição estática (sem agitação) da fibra. Nestes testes a solução padrão foi agitada somente antes da extração, por 2 minutos, com posterior exposição da fibra durante mais 2 minutos. Foram feitos os seguintes testes:

- 10 mL BTEX 20 μ g/L + 3,0 g NaCl, exposição por 2 min.
- 10 mL BTEX 20 μ g/L + 3,0g NaCl, exposição por 10min.

O aumento no tempo de exposição da fibra não resultou em aumento das áreas dos picos dos BTEX, indicando que a condição de equilíbrio foi alcançada mesmo na condição de extração estática conforme pode ser observado na Tabela 13 e na Figura 14.

Tabela 13. Influência da agitação durante extração de BTEX em água por HS SPME. Resultados de área em pico Amperes (pA)

Composto	Tempo de extração* (min) e área dos picos (pA)		
	t = 2 (agit)	t = 2 (est)	t = 10 (est)
Benzeno	3.472.234	3.935.631	4.145.926
Tolueno	12.204.157	12.576.587	13.649.459
Etilbenzeno	31.090.850	30.612.221	34.058.289
m,p-Xilenos	66.976.314	65.733.826	72.796.622
o-Xileno	35.074.486	33.622.087	37.857.428

* Fibra de PDMS, 100µm de fase agitação prévia.

Agit=com agitação; est=estático (sem agitação concomitante).

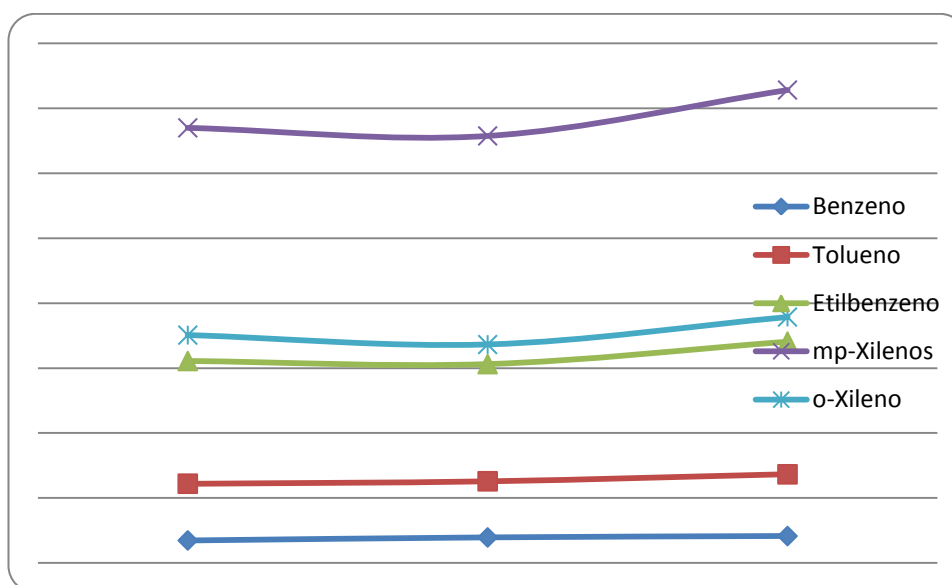


Figura 14. Influência da agitação durante a exposição da fibra na extração por SPME (100 µm PDMS) de solução 20 µg L⁻¹ de BTEX em água.

Como resultado da etapa de otimização, foi possível obter um cromatograma para a gasolina com resolução completa em nível de linha base entre os BTEX e os demais compostos, conforme apresentado na Figura 15.

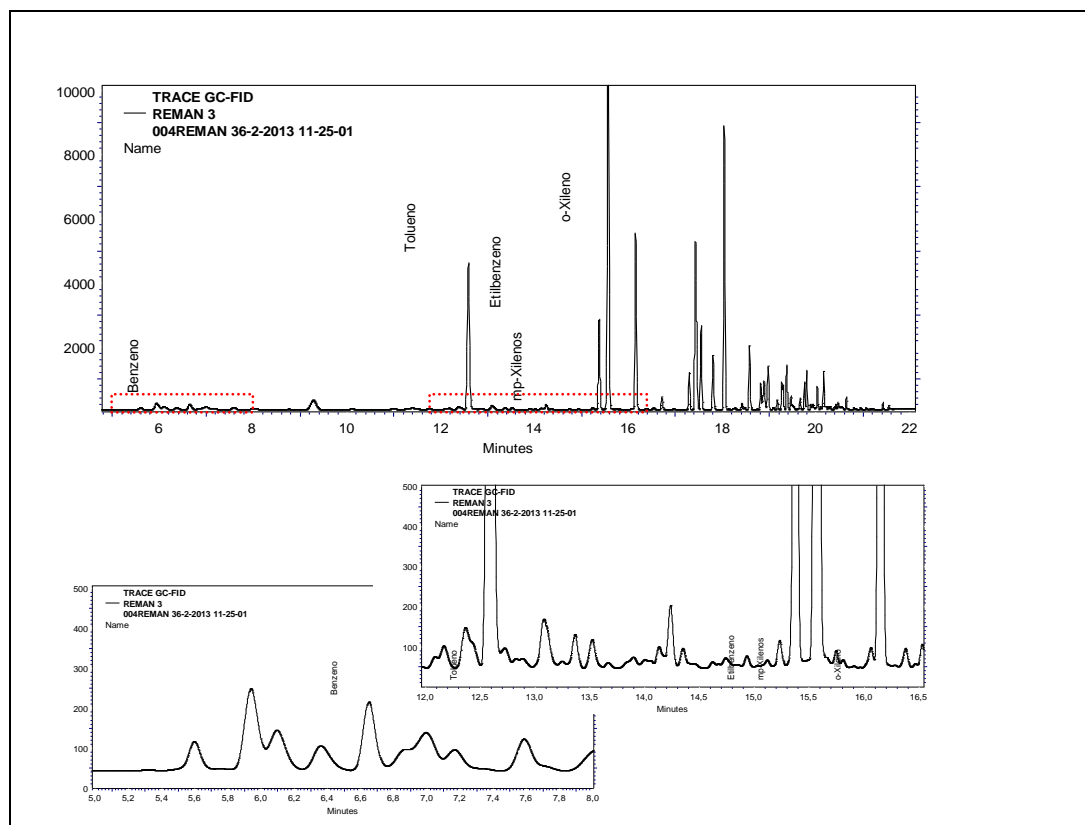


Figura 15. Variação da área dos picos dos BTEX após pré-concentração em fibra de SPME (100 μm PDMS) de solução 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BTEX em água.

4.3. Otimização das condições analíticas no GC-IRMS

Inicialmente foram feitos estudos de otimização da metodologia para pré-concentração em SPME utilizando condições determinadas no sistema GC-FID (Tabela 10, teste 11). A análise das amostras no GC-IRMS envolveu o uso de duas fibras distintas (PDMS e Carboxen-PDMS), sendo alcançados ótimos resultados com soluções aquosas dos padrões de BTEX. No entanto, a aplicação desta técnica nas amostras reais de gasolina mostrou-se inviável, devido ao surgimento de cauda nos picos e elevação da linha base do cromatograma, o que interferiu significativamente nos resultados das razões isotópicas obtidas (Figura 16). Embora o problema desaparecesse com a troca

do *liner* do injetor, seria preciso fazer esta substituição a cada 6 corridas cromatográficas.

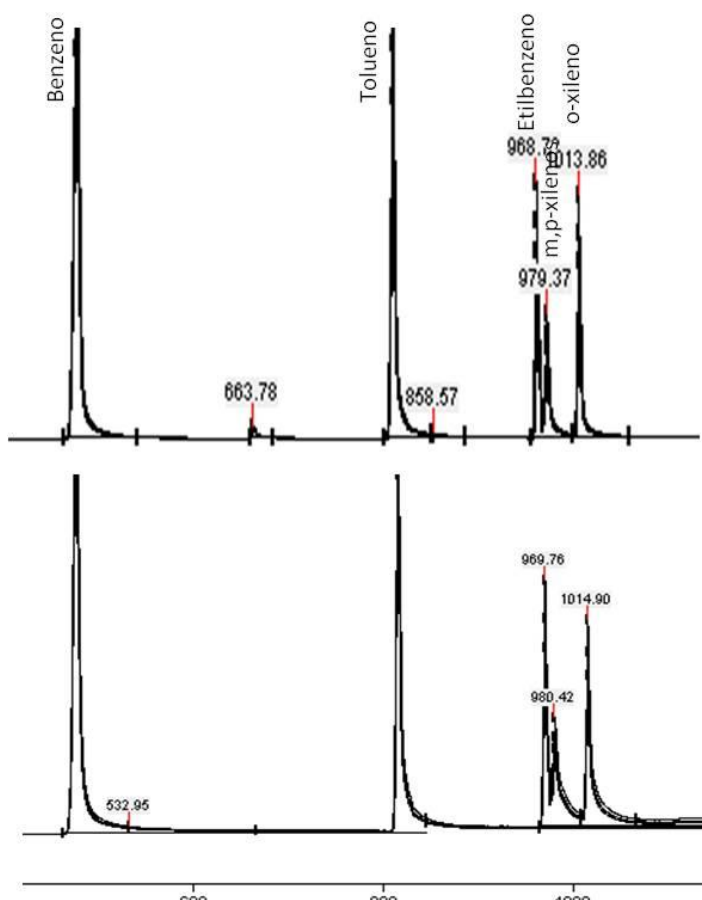


Figura 16. Exemplos do problema na análise de $\delta^{13}\text{C}$ de BTEX em água (CF-IRMS) com pré-concentração por SPME. A) Padrão de BTEX em água sob condições normais; B) Padrão de BTEX em água após algumas injeções de amostras de gasolina em água, sem troca do liner no injetor do cromatógrafo - alargamento dos picos.

Para contornar este problema, optou-se por realizar as análises utilizando-se a técnica de *Headspace*, que embora menos sensível, não apresentou o problema de formação de cauda nos picos. Por outro lado, devido à perda de resolução para o benzeno, este composto não pode ser analisado. A Figura 17 mostra uma comparação entre a resposta do sistema na injeção por SPME e a injeção via *Headspace* para análise de $\delta^{13}\text{C}$ em BTEX de uma amostra de solução aquosa de gasolina da Refinaria R05. Os três pulsos do gás de referência (CO_2) estão na mesma intensidade em todos os cromatogramas.

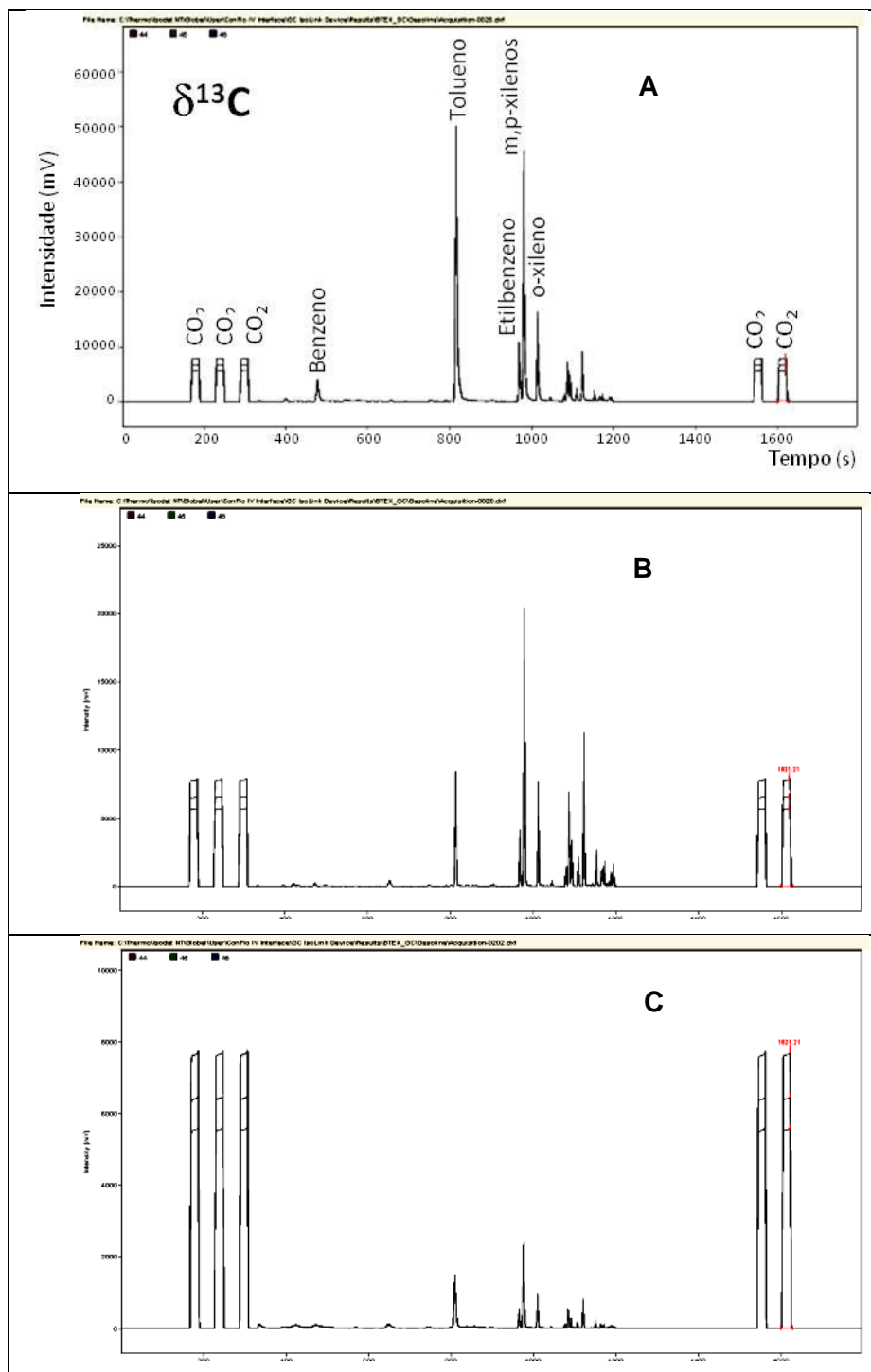


Figura 17. Comparação das respostas obtidas no GC-IRMS para diferentes modos de extração na análise de $\delta^{13}\text{C}$ de BTEX em gasolina (dispersa em água). A) SPME com fibra de Carboxen/PDMS de 75 μm ; B) SPME com fibra PDMS de 100 μm ; C) *Headspace*. Observar, pela altura dos pulsos do gás de referência (CO₂, mesma intensidade em todos os cromatogramas), que extração por headspace fornece a menor resposta.

4.4. Preparação do padrão isotópico de BTEX

Embora a determinação da razão isotópica não forneça a concentração dos analitos, é necessária a construção de uma curva de calibração para determinação da faixa de concentração na qual o equipamento trabalha com linearidade, ou seja, onde as razões são determinadas com precisão. Previamente à construção da curva, as razões isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$) de cada um dos padrões puros BTEX foram determinadas (Tabela 14) via analisador elementar Flash EA, acoplado ao IRMS (EA-IRMS). Estes padrões foram introduzidos no sistema analítico através de um autoamostrador para sólidos, usando adsorventes para evitar a evaporação e consequente fracionamento isotópico antes da conversão no reator. Para as determinações de $\delta^{13}\text{C}$, cada composto foi suportado em Chromosorb W, como descrito por Adami e colaboradores (2010). Para as determinações de $\delta^2\text{H}$ foi usado carvão ativo, previamente aquecido a 170 °C por 4 horas. Esta substância tem a vantagem de ser um adsorvente barato, prontamente disponível no laboratório, e de não apresentar hidrogênio em sua composição. Esta é a primeira citação do uso de carvão ativo para análise de isótopos de hidrogênio total na literatura.

Tabela 14. Razões isotópicas de carbono e hidrogênio dos padrões puros de BTEX, suportados em Chromosorb W (para $\delta^{13}\text{C}$, conforme Adami *et al.*, 2010) e em carvão ativo (para $\delta^2\text{H}$, novo método), determinadas via EA-IRMS

Composto	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) (DP, n=3)	$\delta^2\text{H}$ (‰) (DP, n=3)
Benzeno	-27,4 (0,03)	-108 (2,4)
Tolueno	-27,8 (0,01)	-95 (1,3)
Etilbenzeno	-27,3 (0,03)	-40 (2,4)
m-Xileno	-48,0 (0,03)	-43 (2,1)
o-Xileno	-28,8 (0,01)	-124 (1,1)

Posteriormente, os padrões puros de benzeno, tolueno, etilbenzeno e p-xileno foram combinados em uma solução 20 % de BTEX, a partir da qual foi feita a solução intermediária (solução mãe, aquosa) e as diluições subsequentes em água para determinação da linearidade e também para verificação diária da resposta do equipamento, conforme a Tabela 15 e a Tabela 16.

Tabela 15. Preparação da solução de padrão isotópico e Solução mãe (aquosa)

BTEX PADRÃO Conc. individual	BTEX mãe* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Alíquota (μL)	Diluição (mL)
20 %	100.000	5,7	10

*Concentração final em água

Tabela 16. Curva de concentração para verificar linearidade

Nível	Conc. de BTEX em água ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Alíquota (μL)	Diluição (mL)
1	10	10	100
2*	100	10	10
3	250	25	10
4	500	50	10
5	1000	100	10

*Solução de trabalho usada na avaliação diária da resposta do equipamento

Como a técnica de análise envolve a extração dos BTEX de uma matriz aquosa, as amostras de gasolina foram dispersas em água tomando-se alíquotas de 5 a 25 μL de gasolina, avolumando-se em garrafas de 1000 mL totalmente preenchidas com água ultrapura (Milli-Q), e procedendo-se a agitação magnética por 1 hora com imediata transferência para frascos de vidro de 40 mL dotados de tampa de rosca e septo de teflon, específicos para análise de VOCs Figura 18. As concentrações de BTEX na gasolina pura e nas respectivas soluções de gasolina em água foram determinadas e estão apresentadas nos Anexos 1 e 2. Os perfis cromatográficos das soluções de gasolina em água estão apresentados no Anexo 3. Para a análise isotópica no sistema GC-IsoLink,

foram tomadas alíquotas de 10 mL das amostras de gasolina em água, às quais foram adicionados 3 g de NaCl, previamente à extração no Headspace por 5 minutos (Figura 18 e Quadro 2).

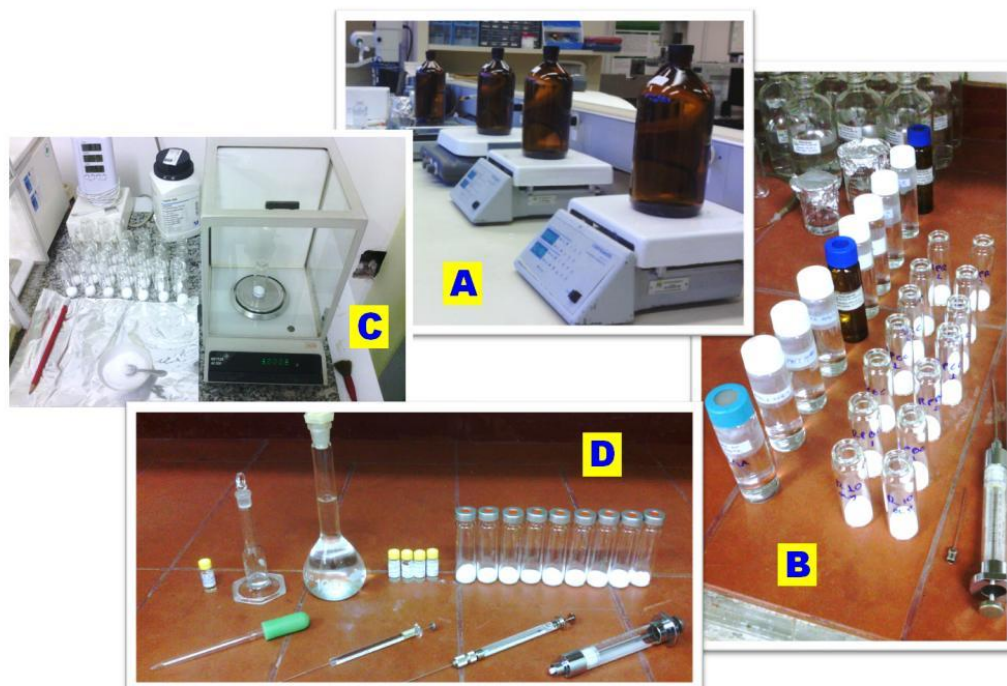


Figura 18. Preparação das amostras de gasolina em água para análise isotópica de hidrogênio via CF-IRMS: A) Dispersão de gasolina (5 a 25 μ L) em (água ultrapura, 1000 mL) e agitação magnética por 1 hora. B) imediata transferência para frascos de vidro de 40 mL dotados de tampa de rosca e septo de teflon, específicos para análise de VOCs; C) Pesagem do NaCl para processo *salting out* durante a etapa de extração em *headspace*; D) Frascos de *headspace* (20 mL), seringas *gas tight* de 5 mL, e microseringas para preparação e transferência das amostras e padrões.

5 Resultados e discussão de gasolina

Para determinação das assinaturas isotópicas de carbono e hidrogênio da gasolina das 12 refinarias de petróleo que a produzem no Brasil, foram injetadas 38 amostras (Figura 19) coletadas em duas a doze campanhas entre 2011 e 2012. Os resultados estão listados na Tabela 17, e a representação gráfica das médias ponderadas encontra-se na Figura 20.



Figura 19. Exemplos de amostras de gasolina recebidas das refinarias para avaliação das razões isotópicas de carbono e hidrogênio no BTEX.

Os resultados de $\delta^2\text{H}$ obtidos foram avaliados com o *software Statistica data analysis software system*, versão 12.0, da Stat Soft Inc. Inicialmente os valores discrepantes (*Outliers*) foram rejeitados tomando como base os testes estatísticos de Chauvenet, Dixon e Grubbs ($\alpha=0,05$). A homocedasticidade dos dados foi então verificada pelos testes de Cochran, Hartley, e Bartlett ($\alpha=0,05$) e a normalidade dos resíduos pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov Smirnov ($\alpha=0,05$). Por fim a comparação dos dados foi realizada com base na análise paramétrica por Análise de Variância (ANOVA *Main Effects*) com nível de significância de $\alpha=0,05$.

Tabela 17. Resultados da implantação da metodologia de CSIA apresentados como médias de duplicata para $\delta^{13}\text{C}$ e triplicata para $\delta^2\text{H}$

REFINARIA	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^2\text{H}$ (‰)			
	TOL	ETB	MPX	OX	TOL	ETB	MPX	OX
R01_1	-26,2	-25,7	-26,1	-25,9	-77	-59	-79	-60
R01_2	-25,9	-25,3	-26,1	-26,7	-75	-55	-76	-53
R01_3	-26,4	-25,6	-26,0	-26,2	-78	-50	-75	-55
R01_4	-26,5	-25,3	-26,1	-26,1	-75	-69	-66	-51
R01_5	-26,4	-25,7	-26,4	-26,3	-81	-65	-79	-64
R01_6	-25,7	-25,9	-25,7	-26,1	-77	-62	-74	-56
R01_7	-25,9	-26,5	-26,2	-26,0	-77	-66	-79	-68
R01_8	-25,9	-27,2	-27,3	-26,2	-76	-63	-78	-63
R01_9	-26,1	-26,3	-26,0	-26,2	-74	-69	-76	-59
R01_10	-25,4	-25,9	-26,1	-25,6	-76	-63	-75	-60
R01_11	-26,1	-26,2	-26,7	-26,7	-76	-65	-79	-63
R01_12	-26,2	-25,8	-27,2	-27,9	-75	-64	-75	-62
R02_1	-25,4	-24,2	-25,0	-25,8	-68	-81	-85	-85
R02_2	-24,8	-22,6	-24,1	-25,3	-67	-76	-77	-68
R02_3	-24,8	-22,5	-23,9	-24,9	-54	-73	-62	-61
R03_1	-26,4	-25,1	-26,2	-26,1	-70	-74	-69	-71
R03_2	-26,2	-25,8	-26,0	-26,4	-75	-78	-67	-69
R03_3	-26,4	-26,1	-26,3	-26,8	-87	-79	-80	-74
R04_1	-25,6	-25,8	-26,0	-26,2	-77	-73	-80	-66
R04_2	-25,6	-24,9	-26,1	-26,2	-77	-72	-77	-63

TOL: tolueno; ETB: etilbenzeno; MPX: m,p-xilenos; OX: orto-xileno.

Tabela 17 (continuação). Resultados da implantação da metodologia de CSIA apresentados como médias de duplicata para $\delta^{13}\text{C}$ e triplicata para $\delta^2\text{H}$

REFINARIA	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^2\text{H}$ (‰)			
	TOL	ETB	MPX	OX	TOL	ETB	MPX	OX
R05_1	-28,0	-27,4	-27,9	-28,0	-86	-86	-87	-70
R05_2	-24,2	-29,3	-26,7	-26,3	-76	-72	-79	-65
R05_3	-27,0	-26,4	-27,0	-27,2	-80	-90	-88	-78
R06_1	-26,1	-25,3	-25,4	-26,8	-88	-81	-88	-69
R06_2	-25,7	-25,9	-26,7	-26,7	-87	-81	-93	-78
R06_3	-28,1	-27,5	-27,5	-27,7	-82	-77	-84	-79
R06_4	-26,2	-25,6	-26,2	-27,0	-78	-73	-82	-76
R07_1	-25,8	-26,2	-26,5	-27,1	-84	-75	-85	-66
R07_2	-26,1	-26,3	-26,0	-25,7	-64	-52	-61	-51
R08_1	-25,7	-26,9	-26,8	-26,0	-74	-68	-78	-68
R08_2	-25,3	-28,3	-26,8	-26,3	-76	-71	-79	-67
R09_1	-25,6	-29,5	-26,9	-26,2	-76	-71	-80	-67
R09_2	-26,2	-29,2	-27,1	-27,0	-75	-74	-80	-67
R10_1	-25,2	-29,2	-26,8	-26,8	-74	-78	-82	-72
R10_2	-25,5	-25,8	-25,8	-26,5	-80	-69	-81	-66
R11_1	-29,5	-29,1	-29,6	-31,0	-74	-68	-77	-64
R11_2	-28,5	-29,6	-29,0	-30,0	-64	-63	-73	-60
R12_1	-24,6	-24,1	-24,1	-26,7	-76	-72	-70	-62
R12_2	-25,4	-24,7	-24,6	-26,7	-97	-93	-97	-83

TOL: tolueno; ETB: etilbenzeno; MPX: m,p-xilenos; OX: orto-xileno.

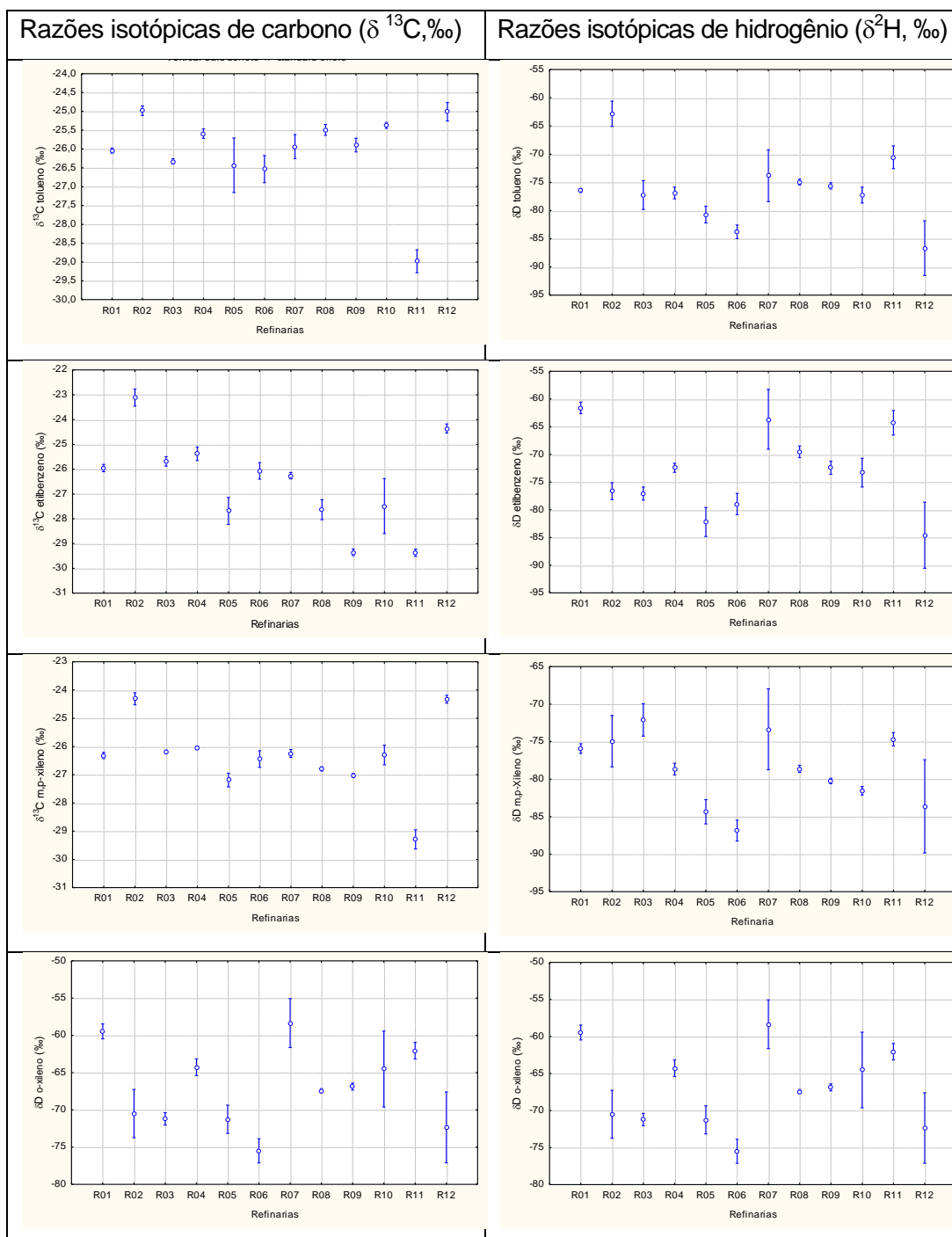


Figura 20. Representação gráfica das médias ponderadas avaliação dos resultados da análise de CSIA de carbono e hidrogênio do BTEX de 38 amostras de gasolina das 12 refinarias.

Os resultados da ANOVA das razões isotópicas de hidrogênio feita individualmente para o tolueno, etilbenzeno, m,p-xileno e o-xileno (Anexo 4) mostraram diversos agrupamentos homogêneos de refinarias para cada um destes parâmetros, dificultando atingir uma avaliação integrada mesmo através de gráficos do tipo x,y.

Como alternativa, os resultados das médias obtidas na ANOVA foram avaliados tridimensionalmente, combinando os quatro BTEX avaliados em grupos de três parâmetros, conforme a Tabela 18. As combinações estão representadas em gráficos 3D na Figura 21 e também da Figura 22 até a Figura 25, sendo que nestas últimas foi feita uma projeção plana de dois parâmetros (eixos x,y) enquanto o terceiro fica fora do plano (eixo z), com as razões isotópicas categorizadas com base nos grupos homogêneos gerados na ANOVA e representadas por cores. Chegou-se assim a um grupo de 12 gráficos contendo todas as informações estatísticas e visuais dos resultados.

Tabela 18. Composição das combinações de $\delta^2\text{H}$ no BTEX para avaliação em gráficos tridimensionais

Combinações	BTEX ($\delta^2\text{H}$)		
1	Tolueno	Etilbenzeno	m,p-Xilenos
2	Tolueno	Etilbenzeno	o-Xilenos
3	Tolueno	m,p-Xilenos	o-Xilenos
4	Etilbenzeno	m,p-Xilenos	o-Xilenos

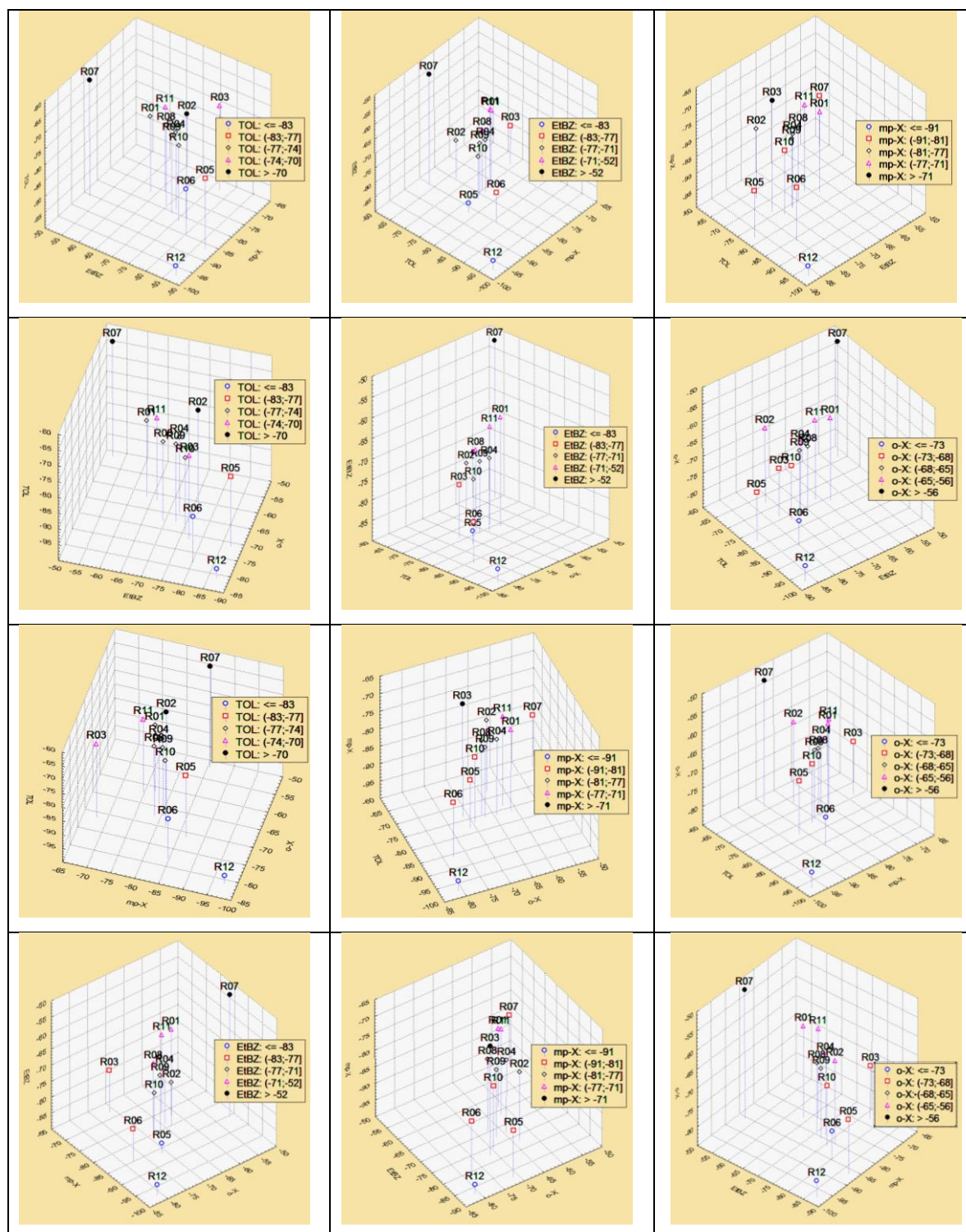


Figura 21. Gráficos 3D de $\delta^2\text{H}$ dos resultados da ANOVA das razões isotópicas de hidrogênio no BTEX da gasolina das refinarias avaliadas.

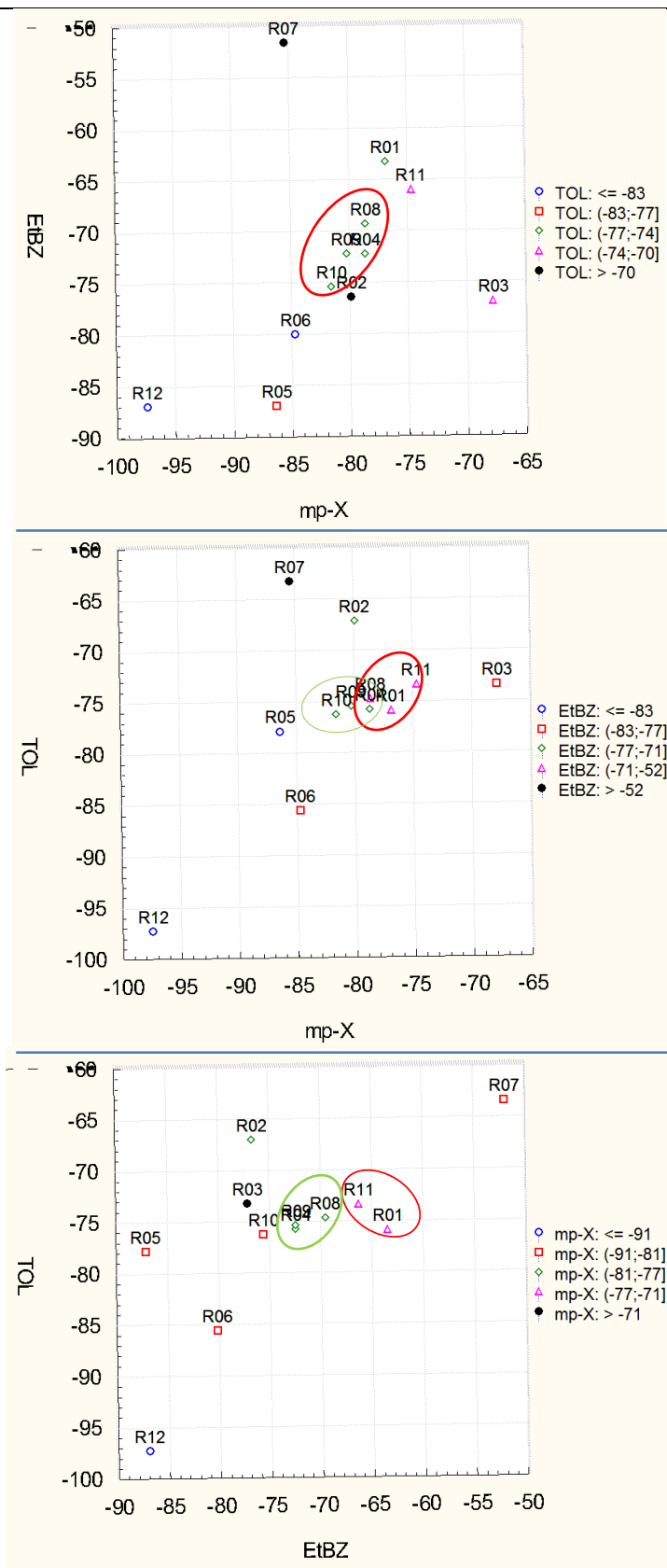


Figura 22. Gráficos de $\delta^2\text{H}$ e categorização de Tolueno; Etilbenzeno; m,p-Xilenos. Elipses verdes e vermelhas agrupam refinarias com base nos resultados das médias obtidas na ANOVA.

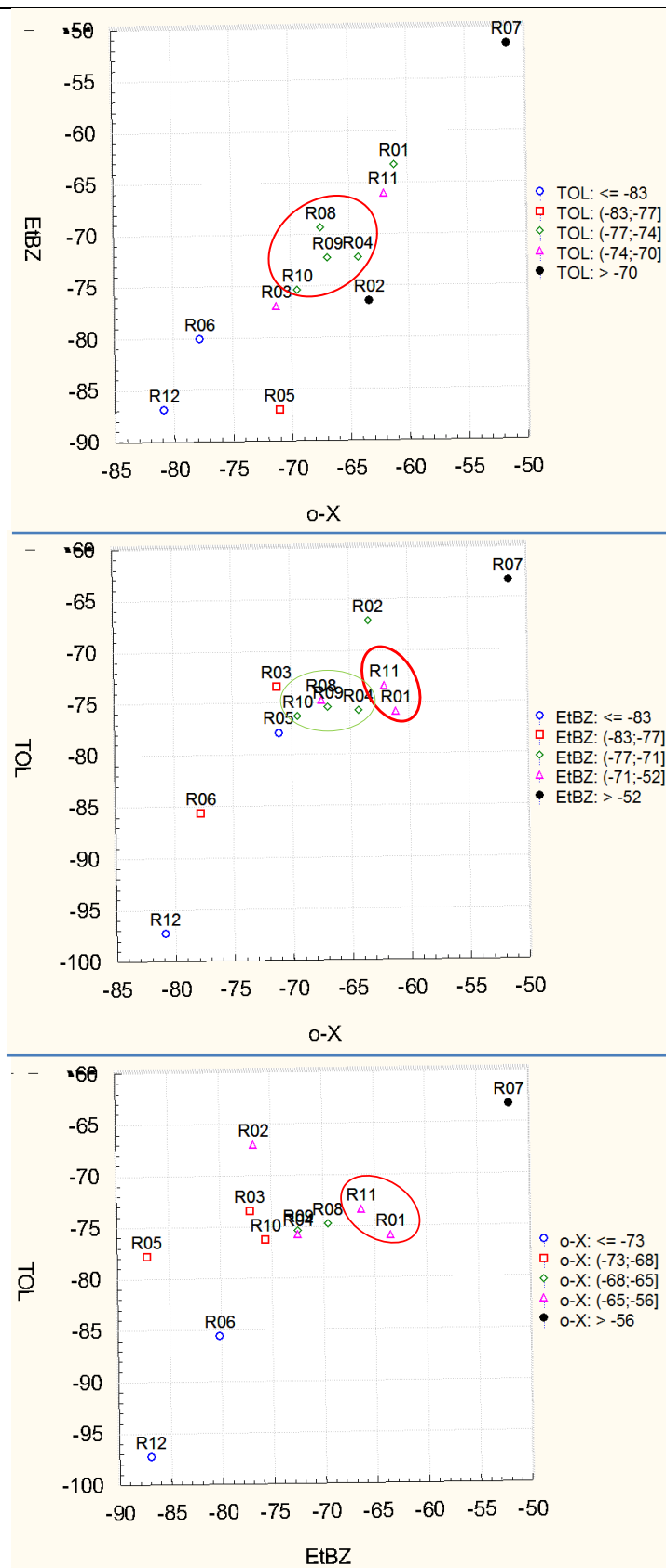


Figura 23. Gráficos de $\delta^2\text{H}$ e categorização de Tolueno; Etilbenzeno; o-Xilenos. Elipses verdes e vermelhas agrupam refinarias com base nos resultados das médias obtidas na ANOVA.

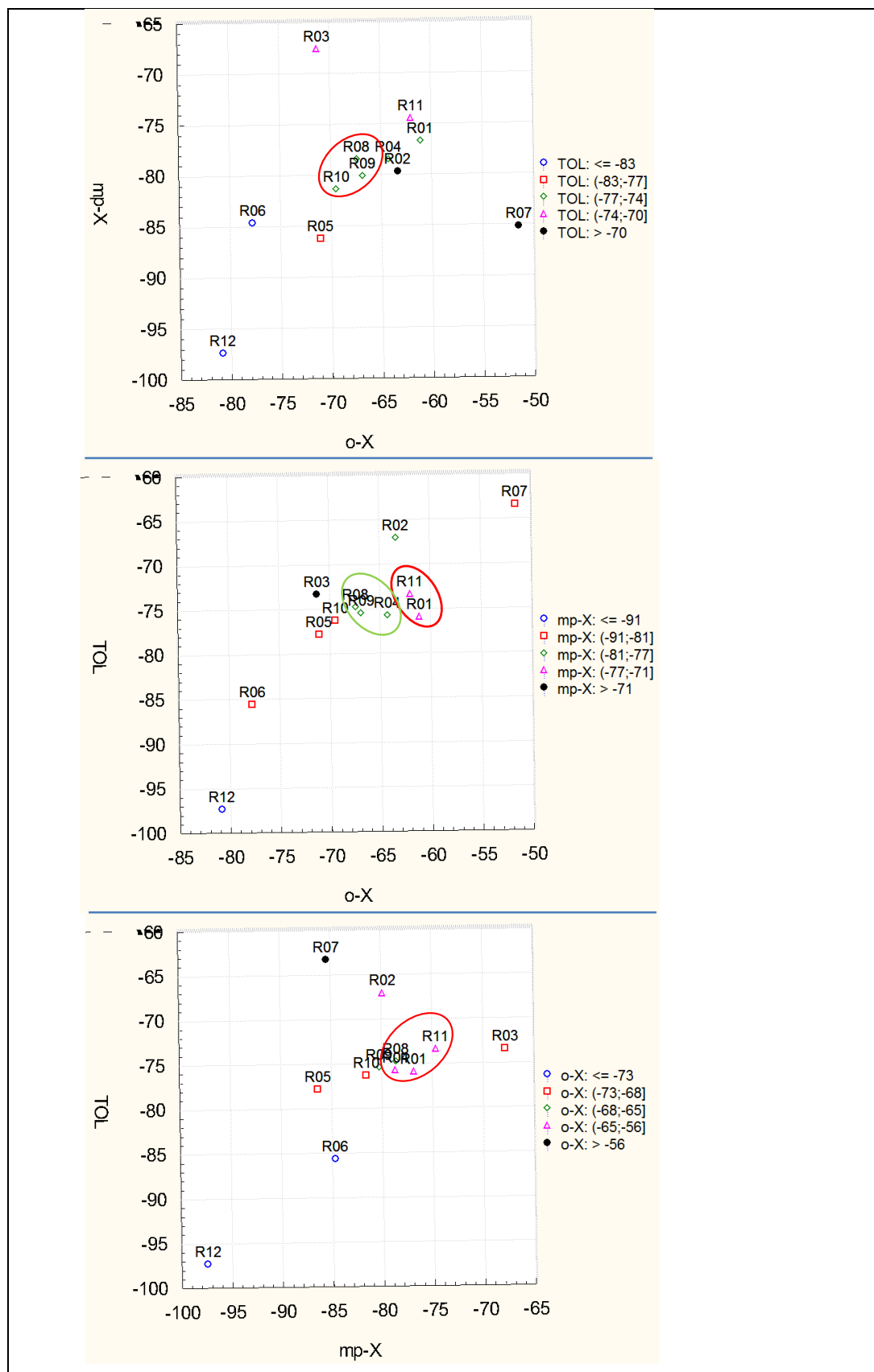


Figura 24. Gráficos de $\delta^2\text{H}$ e categorização de Tolueno; m,p-Xilenos; o-Xilenos. Elipses verdes e vermelhas agrupam refinarias com base nos resultados das médias obtidas na ANOVA.

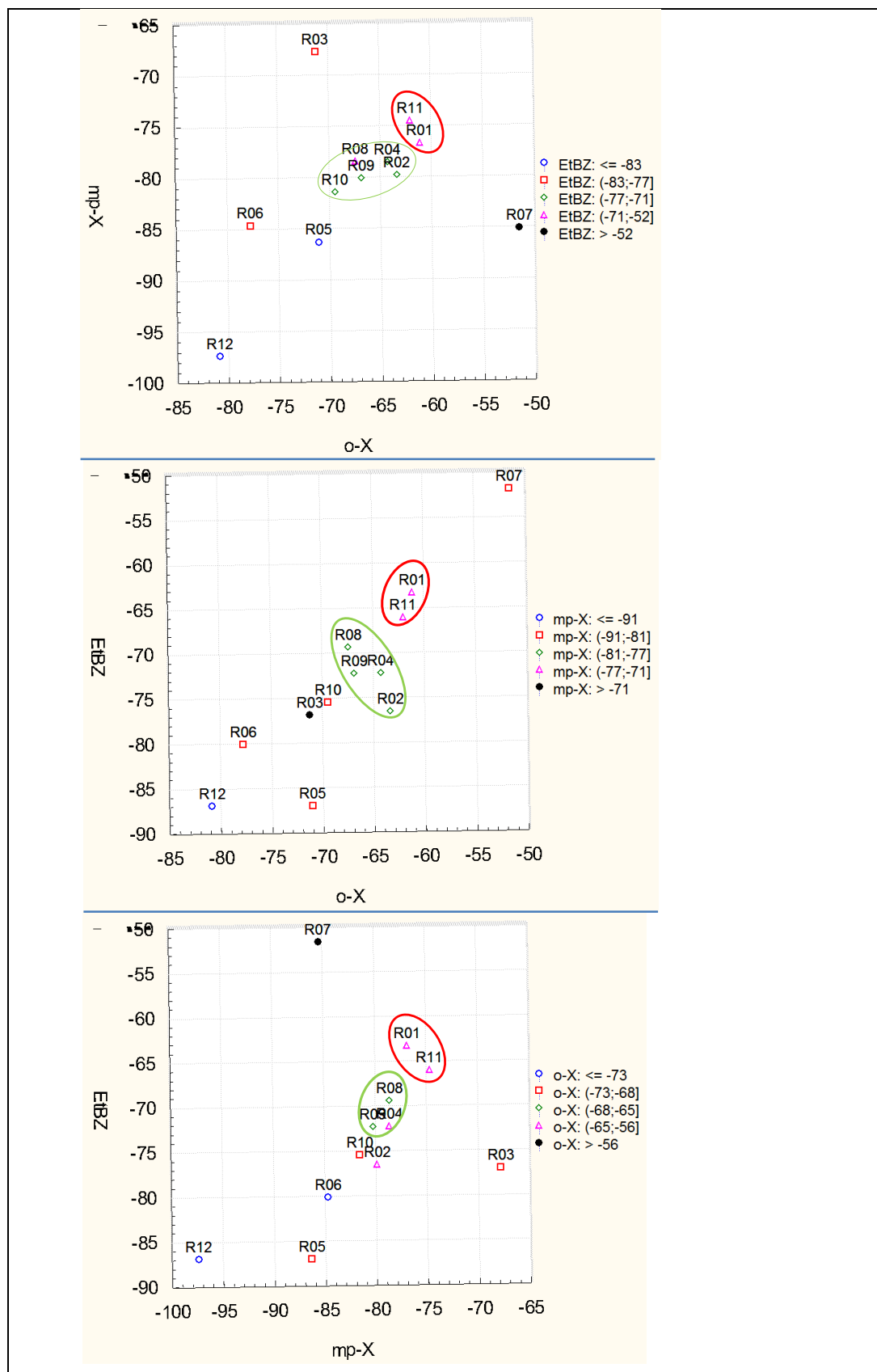


Figura 25. Gráficos de $\delta^2\text{H}$ e categorização de Etilbenzeno; m,p- e o-Xilenos. Elipses verdes e vermelhas agrupam refinarias com base nos resultados das médias obtidas na ANOVA.

A avaliação dos 12 gráficos $\delta^2\text{H}$ em 3D gerados a partir destas quatro combinações permitiu observar que metade das refinarias permaneceu isolada das demais, sugerindo razões isotópicas específicas (R02, R03, R05, R06, R07 e R12), enquanto dois conjuntos menores de refinarias se agruparam de maneira semelhante na maioria dos gráficos (R01 com R11 em um conjunto e R08, R04, R09 e R10 em outro), conforme apresentado na Tabela 19. Estes dois conjuntos de refinarias agrupadas estão destacados nos gráficos por elipses vermelhas e verdes.

Tabela 19. Diferenciação de gasolinas através da análise isotópica

Relação	Refinarias
isoladas	R02, R03, R05 R06, R07 e R12
agrupadas	R01 e R11
	R04, R08, R09 e R10

Apesar dos resultados positivos desta abordagem, é importante ressaltar que, conforme citado no início deste capítulo, foi necessário excluir valores discrepantes (*Outliers*), com base nos testes de Dixon, Grubbs e Chauvenet, para a análise paramétrica por ANOVA, o que é um procedimento comum neste tipo de abordagem. Porém, em alguns casos extremos, dados de uma campanha amostral inteira precisaram ser excluídos, como mostra o Quadro 3. Portanto, os resultados obtidos são válidos somente para as campanhas não excluídas nas análises estatísticas, não podendo ser entendidos como uma regra geral para as refinarias pesquisadas.

Quadro 3. Quantitativo das campanhas excluídas no tratamento estatístico.

- Tolueno: R02 (1/3), R03 (1/3), R05 (1/3), R06 (1/4), R07 (1/2), R12 (1/2);
- Etilbenzeno: R01 (1/12), R05 (1/3), R07 (1/2), R12 (1/2);
- m,p-Xilenos: R01 (1/12), R02 (1/3), R03 (1/3), R06 (1/4), R07 (1/2);
- o-Xileno: R01 (1/12), R02 (1/3), R06 (2/4), R07 (1/2), R12 (1/2).

Por este motivo, e também visando um melhor entendimento do comportamento temporal dos BTEX na gasolina produzida nas refinarias avaliadas e das flutuações observadas, recomenda-se a realização de novas campanhas na forma de um monitoramento de médio a longo prazo, complementado por uma investigação minuciosa da composição das cargas que entram no processo durante a produção do combustível, que podem ser devidas entre outros fatores a oscilação no processo/catalisador, na carga, ou fatores externos, como produção por cabotagem.

Em resumo, conclui-se que o método CSIA por CF-IRMS apresenta grande potencial para diferenciação de fontes de gasolina no meio ambiente.

6 Conclusões para gasolina

Como resultados iniciais deste estudo de diferenciação de fontes de combustíveis utilizando razões Isotópicas de carbono e hidrogênio, foram atingidos os seguintes avanços:

- Determinação de $\delta^2\text{H}$ dos padrões puros de BTEX via EA-IRMS usado carvão ativo como suporte, consistindo na primeira citação do uso deste adsorvente para análise total de isótopos de hidrogênio na literatura. Esta substância tem a vantagem de ser um adsorvente barato, prontamente disponível no laboratório, e não apresentar hidrogênio em sua composição.
- Estabelecimento e implantação da técnica de Análise Isotópica de Compostos Específicos (CSIA - *Compound-Specific Isotope Analysis*) utilizando a técnica de Headspace e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de Razão isotópica (HS-GC/IRMS);
- Caracterização isotópica de hidrogênio da gasolina produzida em 12 refinarias de petróleo brasileiras, através de Análise de Variância e geração de gráficos 3D, que indicaram assinaturas isotópicas de hidrogênio específicas para as refinarias R02, R03, R05 R06, R07 e R12, e padrões de assinaturas isotópicas em comum para R01 e R11, e também para R04, R08, R09 e R10.

Estes resultados iniciais são bastante promissores por mostrarem a viabilidade de diferenciar gasolinas através de suas características isotópicas utilizando Análise Isotópica de Compostos Específicos, possibilitando, por conseguinte, a aplicação deste método em caso de vazamento de gasolina para o meio ambiente.

Neste trabalho também foram ajustadas no GC-FID as condições analíticas para determinação de BTEX em gasolina usando Micro Extração em

Fase Sólida para pré-concentração e injeção dos analitos no sistema cromatográfico. No entanto, não foi possível aplicar esta técnica nas análises via CF-IRMS devido ao surgimento de cauda nos picos e elevação da linha base do cromatograma, o que interferiu significativamente nos resultados das razões isotópicas obtidas.

7

Metodologia para água e etanol

7.1. Área de estudo para água e etanol

Todas as amostras deste estudo foram coletadas em usinas de cana-de-açúcar e canaviais não irrigados nas proximidades, distribuídos em quatro estados diferentes e abrangendo distintas regiões geográficas do Brasil (Figura 26): Amazonas (AM, Norte), Mato Grosso (MT, Centro-Oeste), Rio Grande do Sul (RS, Sul) e São Paulo (SPA, Sudeste). Para este último local a codificação adotada (SPA) não coincide com a sigla do estado para evitar duplicidade com algumas variedades de cana-de-açúcar estudadas, cuja nomenclatura é iniciada por “SP” (ver Tabela 19). Os pontos de referência para o padrão isotópico da água da chuva e para a quantidade de precipitação foram selecionados entre as estações dos bancos de dados do GNIP (*Global Network for Isotopes in Precipitation* - Rede Global de Isótopos na Precipitação) (IAEA/WMO, 2014) e do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) (INMET, 2014) mais próximas, respectivamente.

As campanhas de amostragem no AM foram realizados na Agropecuária Jayoro (1° 59' 17.85" S 60° 8' 27.39" W, altitude 144 m), no município de Presidente Figueiredo. A temperatura média anual neste local é de 25 °C e a precipitação média anual de 2.500 mm (LOPES *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2013). Presidente Figueiredo situa-se na bacia do Rio Uatumã, nos limites das sub-regiões hidrográficas dos rios Negro e Trombetas, os quais pertencem à bacia hidrográfica do rio Amazonas (BRASIL, 2006A). O tipo de solo é latossolo amarelo distrófico (SANTOS *et al.*, 2013).

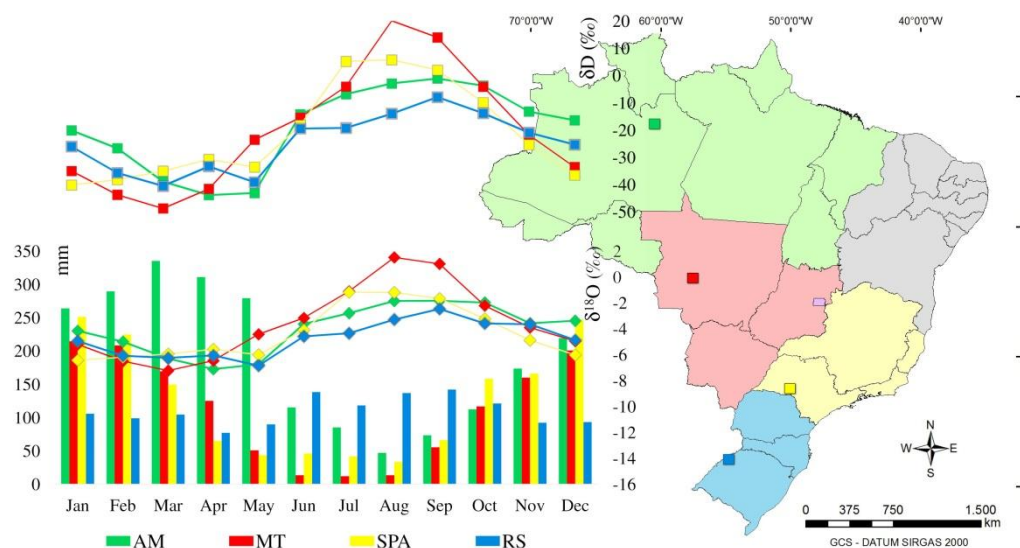


Figura 26. Área de estudo destacando a localização das usinas de cana-de-açúcar (amostragem de etanol, água, planta e solo), a precipitação típica e o padrão isotópico nas estações de referencia mais próximas dos locais de amostragem. Gráficos de dispersão: razões isotópicas de hidrogênio (superior) e oxigênio (inferior) da água de chuva (1965-1987; SP somente em 1996-1998) nas estações do GNIP. Gráfico de colunas: precipitação mensal acumulada (1961-1990) nas estações do INMET.

As campanhas de amostragem no MT foram realizadas na Usina Coprodia (13° 47' 17.33" S 57° 50' 31.31" W, altitude 528 m), no município de Campo Novo do Parecis. A temperatura média nesta local varia entre 24 e 40 °C, onde dois tipos de clima predominam: Equatorial Quente e Úmido, e Tropical Quente e Sub-úmido. O primeiro tipo de clima inclui três meses secos, de Junho a Agosto, e chuva intensa de Janeiro a Março dominada pela massa de ar Equatorial Continental; o segundo tipo de clima inclui quatro meses secos, de Junho a Setembro, e um período chuvoso de Dezembro a Fevereiro, dominado pela massa de ar Continental Tropical (BRASIL, 2006a; FERREIRA, 2001). A precipitação média anual é de 1.796 mm (DE MARCO *et al.*, 2014). A provisão de água para esta usina é oriunda de um afluente do Rio do Sangue, na bacia do Rio Juruena-Arinos, localizada na sub-região hidrográfica do Rio Tapajós, o qual, por sua vez, encontra-se na região hidrográfica do Rio Amazonas (BRASIL, 2006a; FERREIRA, 2001; MATO GROSSO, 2010). Três tipos de solo são encontrados neste local: areia quartzosa, latossolos vermelho e vermelho escuro (BRASIL, 2006a; FERREIRA, 2001).

As campanhas de amostragem em SPA foram conduzidas na Usina Pau D'Alho (22° 46' 4" S 50° 6' 43" W, altitude 458 m), localizada no município de Ibirarema. O clima é Tropical, com temperatura isotérmica anual na faixa de 20 a 22 °C e precipitação anual de 1.511 mm; a estação chuvosa ocorre de Novembro a Fevereiro. Em geral, as condições climáticas nesta região hidrográfica dependem de uma série de fatores, tais como controle da massa Tropical Atlântica, invasão de frentes frias, incursões da massa de ar Continental Tropical associada à Baixa do Chaco (sistema de baixa pressão típico), presença da Zona de Convergência do Atlântico Sul (ZCAS) e distúrbios causados pelo relevo. Este local situa-se na região hidrográfica do Rio Paraná, na sub-bacia do Paranapanema, e o solo predominante é a terra roxa estruturada (BRASIL, 2006b; FGV, 1998).

As campanhas de amostragem no RS foram conduzidas na Coopercana (27° 54' 18.35" S 55° 9' 37.93" W, altitude 125 m), localizada no município de Porto Xavier, próximo à fronteira com a Argentina, distante apenas 2 km do Rio Uruguai. Neste local o clima é Temperado, e as temperaturas médias anuais variam de 16 a 20 °C, aumentando de Maio a Setembro. A distribuição intra-anual da precipitação é regular com média anual de 1.784 mm. A circulação atmosférica é governada pelos sistemas de massas de ar tropicais e polares, com as massas Tropical Atlântica (Ta) e Polar Atlântica (Pa) predominando alternadamente em todas as estações (FGV, 1998; BRASIL, 2006c). Este local situa-se na chamada área do Médio Uruguai, na sub-região hidrográfica do Rio Ijuí, o qual faz parte da região hidrográfica do Rio Uruguai (BRASIL, 2006c), e o solo predominante é o latossolo vermelho distrófico.

As estações de referência do GNIP para razões isotópicas hidrogênio e oxigênio em água da chuva localizadas em Manaus (AM_{GNIP}), Cuiabá (MT_{GNIP}) e Porto Alegre (RS_{GNIP}) possuem um banco de dados para o período de 1965 a 1987. Como os resultados para o estado de São Paulo são escassos, foram usados os dados existentes no GNIP para o período 1996 a 1998 (IAEA/WMO, 2014), obtidos nas estações de Santa Maria da Serra, Campinas, Bragança e Piracicaba (SPA_{GNIP}). Os dados históricos para a precipitação média mensal e a precipitação acumulada anual estão disponibilizados para as estações do INMET localizadas em Manaus (AM_{INMET}), Cuiabá (MT_{INMET}), Porto Alegre (MT_{INMET}), Santa Rita e Campinas (SPA_{INMET}) no período de 1961 a 1990 (INMET, 2014).

7.2. Amostragem para água e etanol

Foram realizadas campanhas de amostragem em 2011, 2012 e 2014. As campanhas de amostragem de 2011, realizadas em Agosto e Novembro, incluíram etanol, cana-de-açúcar e amostras de água de chuva, constituindo um estudo piloto cujos dados analíticos revelaram uma relação complexa entre essas matrizes. As campanhas de 2012, realizada em Julho e Outubro-Novembro, incluíram etanol, cana-de-açúcar, água de chuva, águas superficiais e amostras de solo, visando um melhor entendimento das observações feitas na campanha anterior. Foram amostradas as variedades de cana mais representativas da produção de cada usina. No entanto, não foi possível fazer o acompanhamento de variedades específicas ao longo de campanhas de amostragem subsequentes devido à alternância contínua das variedades cultivadas ao longo do ano no Brasil. Na campanha de 2014, realizada em Setembro, foram coletadas amostras adicionais de água superficial e água subterrânea no MT visando à confirmação do perfil isotópico da água subterrânea local.

As amostras de etanol e água foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C, enquanto as amostras de plantas e solo foram mantidas congeladas a -18 °C.

As amostras de etanol foram coletadas nos reservatórios das respectivas usinas em frascos de vidro transparente, providos de tampas de rosca e septos faceados com Teflon®, e protegidas da luz com papel alumínio.

As amostras de águas pluviais foram coletadas durante eventos de chuva individuais, dois dias antes da amostragem das outras matrizes, usando garrafas de vidro com funil ou recipientes grandes de alumínio e, em seguida, transferidas para frascos de vidro transparente com tampas de rosca e septos faceados com Teflon®. A única exceção foi a amostra coletada em MT, a qual integrou todas as precipitações ao longo de Outubro de 2012. Amostras de água superficial e subterrânea foram coletadas, respectivamente, de sistemas hídricos abertos e poços artesianos, diretamente em frascos de vidro transparente com tampas de rosca e septos faceados com Teflon®.

As amostras de planta foram coletadas nos canaviais, nas vizinhanças das respectivas usinas, cortando uma seção transversal à meia altura das mesmas. Nenhum dos canaviais estudados pratica a queima da cana para o corte. Em 2011 a amostragem envolveu a coleta de uma única planta em cada ponto, a qual foi envolvida em filme de polietileno e armazenada em um frasco de polietileno selado com filme de Teflon®, enquanto em 2012 as plantas foram

coletadas a cada 10 metros ao longo do perímetro de um quadrado de 20 x 20 m, além de uma no centro, somando 9 sub amostras que foram recolhidas como amostra composta final e mantida em um frasco de alumínio selado com filme de Teflon®. A Figura 27 ilustra como foi feita a amostragem de planta e solo nas campanhas de 2012.

As amostras de solo foram coletadas apenas em 2012, em profundidades de 0-5 cm e 20-25 cm, perto do sistema radicular das plantas, no centro do referido quadrado descrito para as amostras de planta, e armazenados em frascos de alumínio selados com filme de Teflon®.

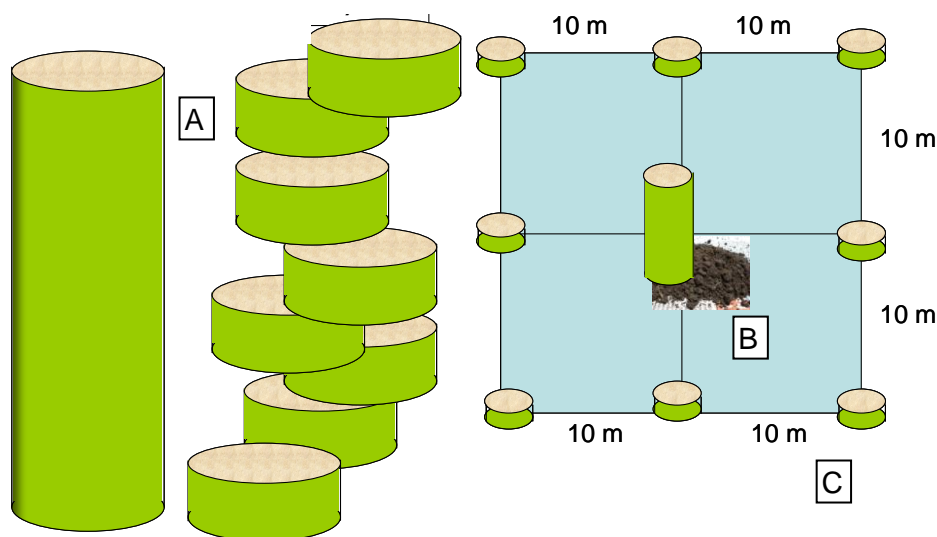


Figura 27. Ilustração da amostragem de cana-de-açúcar e solo nas campanhas de 2012. A) Amostragem de pedaço da planta; B) Amostragem de solo superficial (0-5 cm) e na profundidade das raízes (20-25 cm); C) Obtenção de amostra composta de cana coletando pedaços de planta a cada 10 metros ao longo do perímetro de um quadrado de 20 x 20 m, além de uma no centro.

7.3. Equipamentos, condição analíticas e preparo de amostras

Análises de água

As análises de água foram realizadas através da técnica de Espectroscopia de Infravermelho de Razão Isotópica (IRIS - *Isotope Ratio Infrared Spectroscopy*), utilizando um modelo de analisador de água DLT-100, que se baseia em espectroscopia de cavidade integrada fora do eixo (OA-ICOS -

off-axis integrated cavity output spectroscopy, Los Gatos Research, Mountain View, CA, EUA). Todas as amostras de água foram filtradas em filtros de 0,45 µm e injetadas 6 vezes, descartando os 3 primeiros resultados para evitar o efeito de memória. As amostras de água da planta e do solo foram previamente extraídas por destilação à vácuo em um aparato especialmente projetado, o que possibilitou o processamento de lotes de seis amostras duas vezes por dia. As amostras de água extraídas das plantas foram também submetidas a tratamento com carvão ativo durante vários dias para eliminar qualquer contaminante orgânico co-extraído. As precisões analíticas, expressas como desvio padrão, foram melhores do que $\pm 0,60\text{ ‰}$ para $\delta^{18}\text{O}$ e $\pm 2,80\text{ ‰}$ para $\delta^2\text{H}$ nos resultados de água e água do solo, enquanto, com relação à água da planta, foram melhores do que $\pm 0,74\text{ ‰}$ para $\delta^{18}\text{O}$ e $\pm 3,60\text{ ‰}$ para $\delta^2\text{H}$.

Uma comparação inter-laboratorial foi realizada para as amostras de água da planta, utilizando um analisador modelo L2130-I, que se baseia em Espectroscopia de Cavidade Ressonante tipo *Ring-Down* escaneada por comprimento de onda, (WS-CRDS - *Wavelength-Scanned Cavity Ring-Down Spectroscopy*; Picarro Inc., Sunnyvale, CA, EUA) equipado com um vaporizador modelo A0211 e um módulo de micro-combustão. Os procedimentos são detalhados por Godoy *et al.* (2012), e as precisões analíticas foram melhores do que $\pm 0,25\text{ ‰}$ para $\delta^{18}\text{O}$ e $\pm 0,60\text{ ‰}$ para $\delta^2\text{H}$.

Análises de etanol

Para as análises de etanol, o padrão isotópico adotado para foi o composto fornecido pela VETEC, com grau de pureza P.A., cuja pureza foi confirmada cromatograficamente (CG-FID) sendo considerado adequado para este tipo de uso por não apresentar picos contaminantes. Este padrão de trabalho foi caracterizado isotopicamente por análise em triplicata no EA-IRMS, com a introdução no sistema analítico através de amostrador automático para sólidos, sendo necessário o uso de adsorventes para evitar a evaporação e o consequente fracionamento isotópico antes da conversão no reator. Para a análise de $\delta^{13}\text{C}$ o etanol foi previamente suportado sobre Chromosorb W, tal como descrito por ADAMI *et al.* (2010). Para a análise de $\delta^2\text{H}$, por outro lado, não foi encontrada na literatura pesquisada nenhuma referência similar. Para viabilizar esta análise, o etanol foi, então, suportado sobre carvão ativo previamente tratado por aquecimento a 170 °C durante 4 horas. O carvão ativo

foi escolhido porque ele não contém átomos de hidrogênio e é um adsorvente barato e facilmente disponível. Nenhuma citação anterior foi encontrada na literatura consultada sobre a aplicação de carvão ativado para fins de análise isotópica de $\delta^2\text{H}$ em etanol. Os resultados obtidos para o padrão isotópico de trabalho, etanol VETEC, são apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20. Razões isotópicas de carbono e hidrogênio do padrão de etanol, suportados em Chromosorb W (para $\delta^{13}\text{C}$, conforme Adami *et al.*, 2010) e em carvão ativo (para $\delta^2\text{H}$, novo método), determinadas via EA-IRMS

Composto	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) (DP, n=3)	$\delta^2\text{H}$ (‰) (DP, n=3)
Etanol	-12,6 (0,05)	-193 (4)

A composição isotópica deste padrão de trabalho, bem como as determinações de $\delta^{13}\text{C}$ em amostras cana foram realizadas em um analisador elementar Flash EA 1112 (ThermoQuest, Milão, Itália) equipado com reatores de combustão e conversão térmica e acoplados ao IRMS (EA-IRMS). O reator de combustão (conversão em CO_2 a 1020 °C) foi preparado com um tubo de quartzo preenchido com óxido de cromo, 50 mm; cobre reduzido, 110 mm; cobalto com prata/óxido cobáltico, 30 mm, e uma camada de 1 mm de lã de quartzo na parte superior, inferior e entre as camadas. O reator de conversão térmica (conversão em H_2 a 1450 °C) foi preparado com um tubo cerâmico contendo um tubo reator de carbono vítreo (270 mm), um cadinho de grafite, carbono vítreo granulado, 100 mm; lã de prata, 5 mm; carbono vítreo granulado, 15 mm; lã de quartzo, 15 mm; e lã de prata, 5 mm.

As determinações de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ nas amostras de etanol foram realizadas por CF-IRMS, após uma etapa preliminar de desenvolvimento que envolveu os seguintes passos:

- 1) Escolha do solvente, entre hexano e isooctano, para diluição das amostras de etanol antes da análise no $\delta^{13}\text{C}$ CF-IRMS, sendo definido o isooctano por eluir muito depois do etanol, evitando coeluição com a sua cauda;

- 2) Otimização das condições cromatográficas para determinar os tempos ideais dos pulsos do gás de referência;
- 3) Avaliação de linearidade e repetibilidade para as análises de $\delta^{13}\text{C}$:
Linearidade de 0,25 a 2 mmol mL⁻¹ ;
Repetibilidade: $\delta^{13}\text{C} = 12,26 \text{ ‰}$, DP = 0,09 ‰ (n=19/21; 2 *outliers*);
- 4) Avaliação da repetibilidade para as análises de $\delta^2\text{H}$:
Repetibilidade: $\delta^2\text{H} = 192,3 \text{ ‰}$, DP = 2,0 (n=18/20; 2 *outliers*).

A Figura 28 apresenta exemplos de perfis cromatográficos para as análises de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ no CF-IRMS. Antes da análise todas as amostras foram desidratadas usando peneira molecular UOP tipo 3A (Sigma-Aldrich) de acordo com Monsallier-Bitea *et al.* (2006) e Jamin *et al.* (2003). A peneira molecular foi previamente ativada a 300 °C durante 4 horas e adicionada em pequenas quantidades nos frascos contendo as amostras que, em seguida, foram mantidos refrigerados durante a noite. As amostras desidratadas foram diluídas a 1 mmol L⁻¹ em isooctano e injetadas em *split* de 1:100 para as análises de carbono ou sem diluição no modo *splitless* para análises de hidrogênio. O desempenho do sistema analítico foi constantemente avaliado através da análise do padrão de trabalho intercalado a cada 20 injeções. As precisões analíticas foram melhores do que $\pm 0,15 \text{ ‰}$ para $\delta^{13}\text{C}$ e $\pm 4,8 \text{ ‰}$ para $\delta^2\text{H}$.

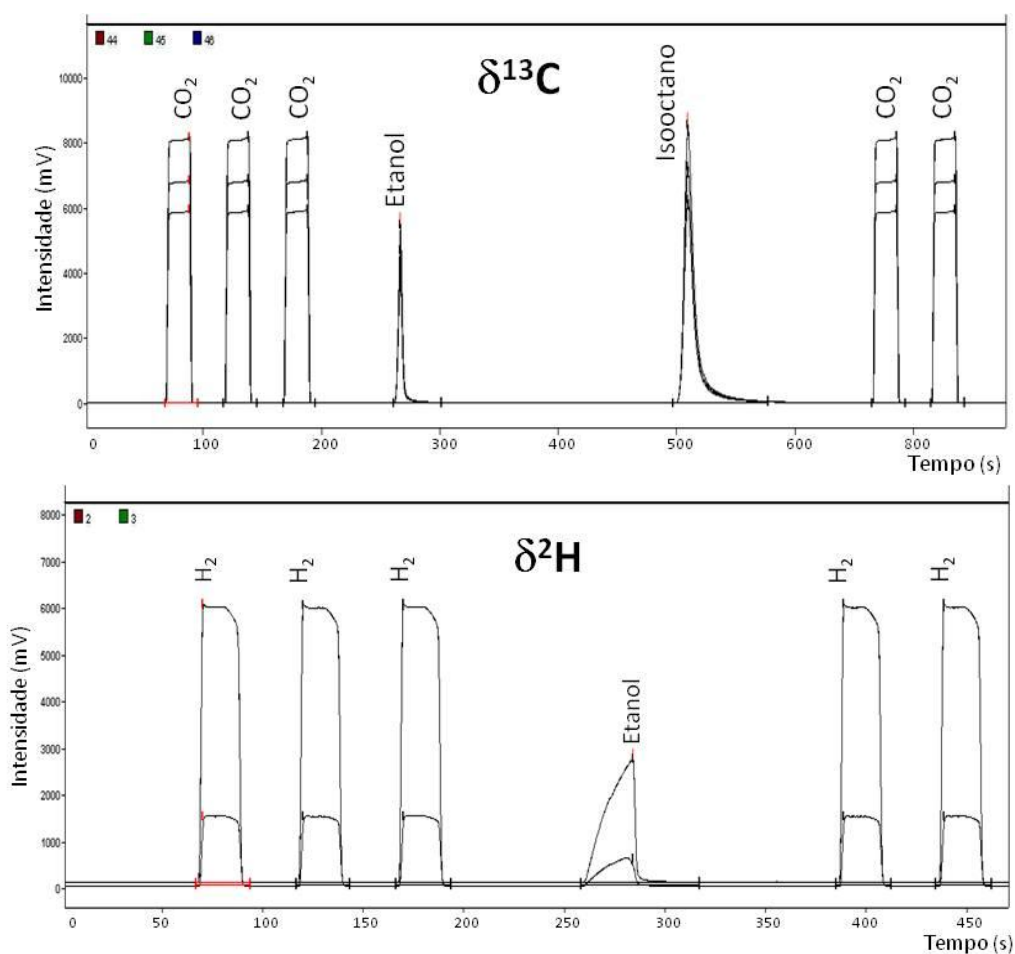


Figura 28. Exemplos de cromatogramas da análise de carbono e de hidrogênio via CF-IRMS.

O sistema analítico para a análise de etanol foi composto de um CF-IRMS Deltaplus V (ThermoFinnigan, Bremen, Alemanha), com *open split*, conectado em linha via sistema Conflo 4 a um cromatógrafo a gás Trace GC Ultra com interface através de um forno de combustão Isolink (Thermo Electron SpA, Milão, Itália). O GC foi equipado com uma coluna capilar DB-624 HP (30 m x 0,45 mm ID x 2,55 μm de filme) e as condições de análise foram as seguintes: temperatura do injetor, 250 $^{\circ}\text{C}$; modo de injeção *split* com uma razão de 100:1 (para análise de carbono) ou *splitless* (para análise de hidrogênio); fluxo de *split* em 150 mL min^{-1} ; gás de arraste em modo de fluxo constante, 1,5 mL min^{-1} ; programação de temperatura do forno: 45 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min, aumentando de 45 $^{\circ}\text{C}$ a 190 $^{\circ}\text{C}$ a 35 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e isoterma de 190 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min. Os volumes de injeção foram de 2 μL . Os fornos Isolink foram fixados em 1000 $^{\circ}\text{C}$ e 1450 $^{\circ}\text{C}$ para razões isotópicas de carbono e de hidrogênio, respectivamente.

Para fins de comparação das razões isotópicas de carbono do produto etanol em relação à sua matéria prima, cana-de-açúcar, este material também foi analisado. As análises de $\delta^{13}\text{C}$ nas amostras cana foram realizadas no mesmo equipamento que as de etanol (EA-IRMS), sendo que as amostras foram previamente liofilizadas e moídas em moinho analítico A11 Basic (IKA Works Inc., Carolina do Norte, EUA).

Os materiais de referência usados para calibração foram: USGS 40, L-ácido glutâmico ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB-LSVEC}} = -26,39 \pm 0,04 \text{ ‰}$) e IAEA-CH-7, Polietileno ($\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -100,3 \pm 2,0 \text{ ‰}$), e VSMOW ($\delta^{18}\text{O} = 0,00 \pm 0,02 \text{ ‰}$, $\delta^2\text{H} = 0,0 \pm 0,3 \text{ ‰}$). Todas as razões isotópicas estão reportadas relativamente ao VSMOW e ao VPDB. Conforme citado anteriormente neste tópico, o padrão de trabalho para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ em etanol foi o álcool etílico P.A. (VETEC) com valores isotópicos determinados como $\delta^{13}\text{C}_{\text{Eanol}} = -12,26 \text{ ‰} \pm 0,05 \text{ ‰}$ e $\delta^2\text{H}_{\text{Eanol}} = -193,4 \text{ ‰} \pm 4,5 \text{ ‰}$.

Para avaliação dos resultados do etanol foi utilizado o software Statistica, versão 12.0 do Stat Soft Inc. Inicialmente os valores discrepantes (*Outliers*) foram rejeitados tomando como base os testes estatísticos de Chauvenet, Dixon e Grubbs ($\alpha=0,05$). A homocedasticidade dos dados foi então verificada pelos testes de Cochran, Hartley, e Bartlett ($\alpha=0,05$) e a normalidade dos resíduos pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov Smirnov ($\alpha=0,05$). Por fim a comparação dos dados foi realizada com base na análise paramétrica por Análise de Variância (ANOVA *Main Effects*) com nível de significância de $\alpha=0,05$.

8

Resultados e discussão de água e etanol

Inicialmente, uma comparação entre os resultados de água da planta obtidos pelas técnicas OA-ICOS e WS-CRDS foi realizada. Esta comparação contemplou apenas as amostras de 2012, e está apresentada na Tabela 21 e Tabela 22. Todos os resultados de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ para água da chuva e de superfície obtidos neste trabalho (campanhas de 2011 e 2012) estão apresentados na Tabela 23, seguidos pelos de água da planta (campanhas de 2011 e 2012) e do solo (campanhas de 2012) na Tabela 24. Os resultados de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{13}\text{C}$ para o etanol e cana (campanhas de 2011 e 2012) estão apresentados na Tabela 25.

8.1. Comparação Interlaboratorial dos resultados de água da planta

A análise de água em plantas por IRIS pode sofrer desvios devido à presença de metanol ou etanol residual após o processo de destilação (SCHULTZ *et al.*, 2011; BRAND *et al.*, 2009; LEEN *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2012), resultando em discrepâncias de até 7,97 ‰ e 13,70 ‰ nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$, respectivamente, para água extraída de amostras de caule (SCHULTZ *et al.*, 2011). Este problema, que não ocorre nas análises de água do solo, pode ser corrigido através da utilização de um software de pós-processamento em equipamentos OA-ICOS (não disponível para aplicação no presente estudo), desde que a quantidade esperada desses contaminantes seja conhecida, o que requer a comparação dos resultados obtidos com os gerados por um GC-IRMS ou por outra técnica que elimine a interferência. Todas as amostras de água neste estudo foram analisadas no equipamento Los Gatos DLT-100 e, para verificar um possível desvio nos resultados obtidos, estas amostras foram reanalisados em um equipamento Picarro L2130-I dotado de um módulo de micro combustão, assim eliminando qualquer interferência orgânica. As diferenças isotópicas entre as médias dos resultados variaram entre 0,58 e 2,25 ‰ (mediana de 0,20 ‰) para oxigênio e 0,25 e 7,25 ‰ (mediana de 2,57 ‰) para o hidrogênio. A comparação estatística de suas variâncias (teste F)

e médias (teste t) mostrou que, respectivamente, 83 % e 78 % dos resultados $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ não foram estatisticamente diferentes em níveis de significância de 0,05 a 0,02 (Tabela 21 e Tabela 22), indicando não haver desvio nos resultados das amostras de água da planta obtidos neste estudo.

Tabela 21. Testes de significância (MILLER e MILLER, 1989) para $\delta^{18}\text{O}$ em água da planta obtido no OA-ICOS e WS-CRDS

Informações de Amostragem			$\delta^{18}\text{O}$ WS-CRDS (Picarro)			$\delta^{18}\text{O}$ OA-ICOS (Los Gatos)			Testes de Significância		
Local	Variedade da cana	Campanha	Média (‰)	n	DP (‰)	Média (‰)	n	DP (‰)	$F_{2,3}$	t calc	gl
AM	RB 835486	Nov-2012	-1,96	4	0,05	-2,16	3	0,22	20,40	1,51	2
	SP 813250	Out-2012	-3,04	4	0,06	-3,33	3	0,19	10,27	1,71	5
	SP 791011	Out-2012	-2,36	4	0,02	-2,64	3	0,23	151,90	2,10	2
	RB 835486	Out-2012	-1,98	4	0,05	-1,9	3	0,33	51,01	-0,39	2
MS	RB 867515	Jul-2012	-7,70	4	0,02	-8,47	3	0,74	1348,72	1,81	2
	RB 867515	Jul-2012	-5,48	4	0,06	-5,62	3	0,22	12,91	0,76	5
	P5 828064	Jul-2012	-8,35	4	0,07	-8,66	3	0,22	10,07	1,59	5
	RB 928064	Jul-2012	-6,95	4	0,03	-6,81	3	0,19	35,13	-1,25	2
	RB 835486	Jul-2012	-7,83	4	0,02	-8,62	3	0,26	262,33	5,22	2
	RB 92570	Jul-2012	-7,71	4	0,05	-8,05	3	0,26	25,63	2,21	2
	RB 928064	Out-2012	-1,52	4	0,03	-1,54	3	0,44	259,02	0,09	2
	RB 791011	Out-2012	-7,54	4	0,03	-7,39	3	0,20	38,80	-1,31	2
	RB 867515	Out-2012	-1,45	4	0,06	-1,65	3	0,40	49,42	0,84	2
	RB 867515	Out-2012	-4,89	2	0,25	-7,14	3	0,16	0,42*	10,51	3

DP: Desvio Padrão; gl: graus de liberdade; $F_{\text{teste}} = SD_1^2/SD_2^2$; $F_{\text{crit},2,3}=16,04$; (*) $F_{\text{crit},2,1}=799,5$; Valores em negrito referem-se a DP não significativamente diferentes, baseado no Teste F t_{calc} : Azul= estatisticamente não diferente em um nível de significância de 0,05; Amarelo = estatisticamente não diferente em um nível de significância de 0,02; Vermelho: estatisticamente diferente

Tabela 21 (cont.). Testes de significância (MILLER e MILLER, 1989) para $\delta^{18}\text{O}$ obtido por OA-ICOS e WS-CRDS em água da planta

Informações de Amostragem			$\delta^{18}\text{O}$ WS-CRDS (Picarro)			$\delta^{18}\text{O}$ OA-ICOS (Los Gatos)			Testes de Significância		
Local	Variedade da cana	Campanha	Média (‰)	n	DP (‰)	Média (‰)	n	DP (‰)	$F_{2,3}$	t calc	gl
SPA	SP 813250	Aug-2012	-3,03	4	0,05	-2,45	3	0,15	9,22	-4,37	5
	RB 867515	Aug-2012	-4,11	4	0,05	-3,97	3	0,14	7,65	-1,08	5
	RB 855456	Aug-2012	-1,06	4	0,05	-2,48	3	0,09	3,75	15,48	5
RS	RB 855156	Jul-2012	-2,84	4	0,02	-4,11	3	0,16	50,34	13,60	2
	RB 867515	Jul-2012	-3,54	4	0,07	-3,19	3	0,21	9,77	-1,92	5
	SP 813250	Jul-2012	-3,75	4	0,03	-3,43	3	0,24	86,40	-2,31	2
	SP 813250	Out-2012	-2,26	4	0,07	-2,17	3	0,23	9,50	-0,42	5
	RB 855156	Out-2012	-4,82	4	0,04	-4,73	3	0,28	41,47	-0,58	2
	RB 867515	Out-2012	-6,33	4	0,06	-6,65	3	0,23	14,64	2,38	2

DP: Desvio Padrão; gl: graus de liberdade; $F_{\text{teste}} = \text{SD}_1^2 / \text{SD}_2^2$; $F_{\text{crit},2,3}=16,04$; (*) $F_{\text{crit},2,1}=799,5$; Valores em negrito referem-se a DP não significativamente diferentes, baseado no Teste F t_{calc} : Azul= estatisticamente não diferente em um nível de significância de 0,05; Amarelo = estatisticamente não diferente em um nível de significância de 0,02; Vermelho: estatisticamente diferente.

Tabela 22. Testes de significância (MILLER e MILLER, 1989) para $\delta^2\text{H}$ obtidos por OA-ICOS e WS-CRDS em água da planta

Informações de Amostragem			$\delta^2\text{H}$ WS-CRDS (Picarro)			$\delta^2\text{H}$ OA-ICOS (Los Gatos)			Testes de Significância		
Local	Variedade da cana	Campanha	Média (‰)	n	DP (‰)	Média (‰)	n	DP (‰)	$F_{2,3}$	t calc	gl
AM	RB 835486	Nov-2012	-12,78	4	0,15	-14,34	3	1,65	124,59	1,64	2
	SP 813250	Out-2012	-18,69	4	0,20	-22,03	3	1,06	29,25	5,37	2
	SP 791011	Out-2012	-14,45	4	0,13	-17,53	3	1,60	152,71	3,33	2
	RB 835486	Out-2012	-12,79	4	0,22	-14,21	3	2,01	80,13	1,22	2
MS	RB 867515	Jul-2012	-51,62	4	0,44	-55,7	3	2,79	41,11	2,51	2
	RB 867515	Jul-2012	-45,85	4	0,21	-48,78	3	2,03	97,95	2,49	2
	P5 828064	Jul-2012	-65,13	4	0,12	-66,63	3	1,65	182,64	1,57	2
	RB 928064	Jul-2012	-52,97	4	0,04	-55,2	3	2,18	3676,43	1,77	2
	RB 835486	Jul-2012	-64,57	4	0,16	-67,42	3	1,07	44,82	4,60	2
	RB 92570	Jul-2012	-59,50	4	0,12	-61,6	3	0,96	62,90	3,75	2
	RB 928064	Out-2012	-19,19	4	0,60	-20,32	3	3,59	35,84	0,54	2
	RB 791011	Out-2012	-59,11	4	0,18	-61,56	3	0,70	14,27	4,04	5
	RB 867515	Out-2012	-9,14	4	0,21	-12,27	3	1,36	40,31	3,95	2
	RB 867515	Out-2012	-45,42	2	0,45	-52,67	3	1,34	8,98	5,89	3

DP: Desvio Padrão; gl: graus de liberdade; $F_{\text{teste}} = \frac{SD_1^2}{SD_2^2}$; $F_{\text{crit}2,3}=16,04$; (*) $F_{\text{crit}2,1}=799,5$; Valores em negrito referem-se a DP não significativamente diferentes, baseado no Teste F t_{calc} : Azul= estatisticamente não diferente em um nível de significância de 0,05; Amarelo = estatisticamente não diferente em um nível de significância de 0,02; Vermelho: estatisticamente diferente.

Tabela 22. (cont). Testes de significância (MILLER e MILLER, 1989) para $\delta^2\text{H}$ obtidos por OA-ICOS e WS-CRDS em água da planta

Informações de Amostragem			$\delta^2\text{H}$ WS-CRDS (Picarro)			$\delta^2\text{H}$ OA-ICOS (Los Gatos)			Testes de Significância		
Local	Variedade da cana	Campanha	Média (‰)	n	DP (‰)	Média (‰)	n	DP (‰)	$F_{2,3}$	t calc	gl
SPA	SP 813250	Aug-2012	-19,70	4	0,33	-19,95	3	1,01	9,36	0,28	5
	RB 867515	Aug-2012	-24,99	4	0,20	-27,53	3	1,65	65,27	2,65	2
	RB 855456	Aug-2012	-16,90	4	0,27	-22,98	3	1,23	21,51	8,41	2
RS	RB 855156	Jul-2012	-22,97	4	0,09	-29,52	3	1,46	295,05	7,74	2
	RB 867515	Jul-2012	-18,39	4	0,26	-21,66	3	0,76	8,32	4,78	5
	SP 813250	Jul-2012	-19,48	4	0,23	-22,08	3	1,20	27,68	3,70	2
	SP 813250	Out-2012	-7,94	4	0,24	-8,81	3	1,35	30,80	1,11	2
	RB 855156	Out-2012	-30,44	4	0,10	-31,89	3	2,02	392,59	1,24	2
	RB 867515	Out-2012	-45,84	4	0,14	-47,87	3	0,91	41,69	3,83	2

DP: Desvio Padrão; gl: graus de liberdade; $F_{\text{teste}} = \text{SD}_1^2 / \text{SD}_2^2$; $F_{\text{crit2,3}} = 16,04$; (*) $F_{\text{crit2,1}} = 799,5$; Valores em negrito referem-se a DP não significativamente diferentes, baseado no Teste F t_{calc} : Azul= estatisticamente não diferente em um nível de significância de 0,05; Amarelo = estatisticamente não diferente em um nível de significância de 0,02; Vermelho: estatisticamente diferente.

8.2. Água de chuva, superficial e subterrânea

Os resultados para os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ em águas da chuva e de superfície encontraram-se em uma ampla faixa, embora a precipitação tenha apresentado a maior variabilidade (Tabela 23). Conforme mencionado na seção Área de Estudo, os padrões hidrológicos para estes lugares foram estimados por comparação com os dados históricos de estações do GNIP e do INMET (Figura 26).

A quantidade de precipitação tem uma importante influência sobre a composição isotópica de água da chuva, devido ao chamado efeito de quantidade, resultando no seu enriquecimento durante a estação seca (CLARK E FRITZ, 1997; MARTINELLI *et al.*, 2009), como mostrado na Figura 26 para todas as estações de referência. No AM, as maiores precipitações ocorrem no início do ano; no MT uma importante seca acontece no meio do ano, de forma semelhante, porém menos atenuada, do que em SPA; e o RS tem uma distribuição regular de chuva ao longo de todo o ano. No MT praticamente não ocorrem chuvas na área da plantação durante todo o período de colheita de Maio a Outubro, e a influência dessa condição climática revela-se nas razões isotópicas de hidrogênio e oxigênio na água da planta e na água do solo, como será discutido adiante. Flutuações isotópicas na chuva em regiões tropicais parecem ser regidas pelo processo chuvoso na região do entorno, ao invés de depender do histórico de chuva local (KURITA *et al.*, 2009), de modo que a comparação com os dados do INMET GNIP pode ser considerada uma boa abordagem para os efeitos isotópicos de quantidade neste estudo.

Tabela 23. Razões isotópicas de oxigênio e hidrogênio nas amostras de água coletadas neste estudo e nas estações de referência do GNIP

Amostra	Campanha	Fonte	$\delta^{18}\text{O}$ (‰)	$\delta^2\text{H}$ (‰)
AM Chuva 1	Ago/2011	Chuva	-6,4	-29,2
AM Chuva 2	Nov/2011	Chuva	-4,6	-22,7
AM Chuva 3	Out/2012	Chuva	-1,02	1,17
AM Chuva 4	Out/2012	Chuva	-1,49	0,89
AM Chuva 5	Nov/2012	Chuva	-0,03	5,29
AM Água 1	Out/2012	Igarapé	-4,20	-23,41
AM Água 2	Out/2012	Igapó	-4,67	-27,68
AM Água 3	Nov/2012	Igarapé	-5,26	-29,95
MT Chuva 1	Out/2012	Chuva	-1,60	-1,80
MT Água 1	Jul/2012	Rio do Sangue (reservatório)	-6,53	-43,36
MT Água 2	Jul/2012	Vinhaça (efluente)	-4,56	-26,74
MT Água 3	Set/2014	Rio do Sangue (reservatório)	-7,44	-42,64
MT Água 4	Set/2014	Rio do Sangue	-7,95	-42,96
MT Água 5	Set/2014	Rio Verde	-7,62	-44,15
MT Água 6	Set/2014	Poço artesiano 1	-7,42	-43,05
MT Água 7	Set/2014	Poço artesiano 2	-7,39	-42,74
SPA Chuva 1	Nov/2011	Chuva	-3,5	-16,5
SPA Água 1	Ago/2012	Lagoa do Bom Retiro	-4,12	-29,01
SPA Água 2	Ago/2012	Água de processo	-4,20	-27,91
SPA Água 3	Ago/2012	Vinhaça (efluente)	-2,55	-13,60
RS Chuva 1	Ago/2011	Chuva	-2,90	0,30
RS Chuva 2	Nov/2011	Chuva	-9,60	-65,90
RS Chuva 3	Jul/2012	Chuva	-1,13	7,97
RS Chuva 4	Out/2012	Chuva	-2,73	-7,52
RS Chuva 5	Out/2012	Chuva	-2,74	-7,89
RS Água 1	Jul/2012	Rio Uruguai	-4,90	-27,95
RS Água 2	Out/2012	Rio Uruguai	-4,38	-26,85
Valores médios de água superficial (2011-2012)			-4,54	-27,65
AM _{GNIP} (*)	1965-87	Chuva, Manaus	-5,15	-27,68
MT _{GNIP} (*)	1965-87	Chuva, Cuiabá	-5,40	-34,56
MT _{GNIP} (**)	1965-87 (Nov-Apr)	Chuva, Cuiabá	-6,15	-40,65
SPA _{GNIP} (*)	1996-98	Chuva, São Paulo	-5,15	-27,95
RS _{GNIP} (*)	1965-87	Chuva, Porto Alegre	-4,83	-25,84

(*) Médias ponderadas das razões isotópicas de oxigênio e hidrogênio nas precipitações anuais, calculadas a partir do banco de dados do GNIP, representando a assinatura isotópica da água subterrânea (CLARK E FRITZ, 1997; KENDALL *et al.*, 2014).

(**) Médias ponderadas das razões isotópicas de oxigênio e hidrogênio nas chuvas entre Novembro e Abril (período chuvoso), calculadas a partir do banco de dados do GNIP (IAEA/WMO, 2014).

Com exceção do MT, os resultados de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ da água superficial ficaram próximos das médias de -4,54 ‰ e -27,65 ‰ encontradas nas amostragens de 2011-2012 (Tabela 23). Estes valores estão de acordo com as médias ponderadas de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ para a precipitação anual nas estações de referência GNIP (Tabela 23), as quais representariam a assinatura isotópica da água subterrânea nestas bacias hidrográficas (CLARK E FRITZ, 1997; KENDALL *et al.*, 2014). As diferenças observadas para as amostras do MT podem ser atribuídas à forte seca que ocorre regularmente de Maio a Outubro naquele local. A comparação dos resultados de rios e das águas subterrâneas do MT com a média ponderada para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ da referência MT_{GNIP} durante a estação chuvosa (Tabela 23) revelou um empobrecimento isotópico neste local, resultante do período de recarga na bacia de drenagem. Esta avaliação indica fortemente que os aquíferos e reservatórios de água avaliados neste trabalho reproduzem a assinatura isotópica da água subterrânea devido à recarga do freático pela água da chuva. As duas amostras de vinhaça, subprodutos do processo de moagem da cana, coletadas de diques no MT (Figura 29) e SPA, parecem estar altamente enriquecidas em relação à água fresca superficial, provavelmente devido à evaporação.



Figura 29. Dique de vinhaça no MT.

Craig (1961) reportou uma relação global entre $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ na precipitação, conhecida como a linha meteórica global da água (GMWL - *global meteoric water line*), que pode ser expressa pela regressão $\delta^2\text{H} = 8 \delta^{18}\text{O} + 10$ e fornece informações importantes sobre um determinado local, uma vez que os deslocamentos isotópicos são basicamente uma função da temperatura local, da altitude e a distância a partir do oceano. Linhas Meteóricas Locais da Água para a Referência (LMWL_{GNIP} - *Local Meteoric Water Line*) foram traçadas usando

dados de água da chuva do GNIP e comparadas com as respectivas LMWL propostas a partir de amostras de água coletadas no presente trabalho (Figura 30). Nestes gráficos, valores de inclinação menores que a da $LMWL_{GNIP}$ indicam enriquecimento, o que é típico para água de reservatórios, como por exemplo os lagos, que são mais propensos a evaporar. Por outro lado, valores de inclinação superiores ao da $LMWL_{GNIP}$ devem representar empobrecimento, o que pode ter várias causas, como os efeitos da altitude e continental (CLARK E FRITZ, 1997). AM e MT mostraram inclinações da LMWL semelhantes entre si e ambas menores do que a respectiva estação $LMWL_{GNIP}$. A menor inclinação da LMWL para as amostras do AM em relação ao respectivo $LMWL_{GNIP}$ pode ser devido à contribuição de vapor d'água isotopicamente enriquecimento, liberado pela evapotranspiração da floresta amazônica, enquanto a maior inclinação da LMWL para amostras do RS deve estar relacionada com a complexidade orográfica e o posicionamento latitudinal (DIAS E MARENGO, 2002) desse local. Devido ao número reduzido de amostras, não foi possível traçar uma LMWL confiável para SPA.

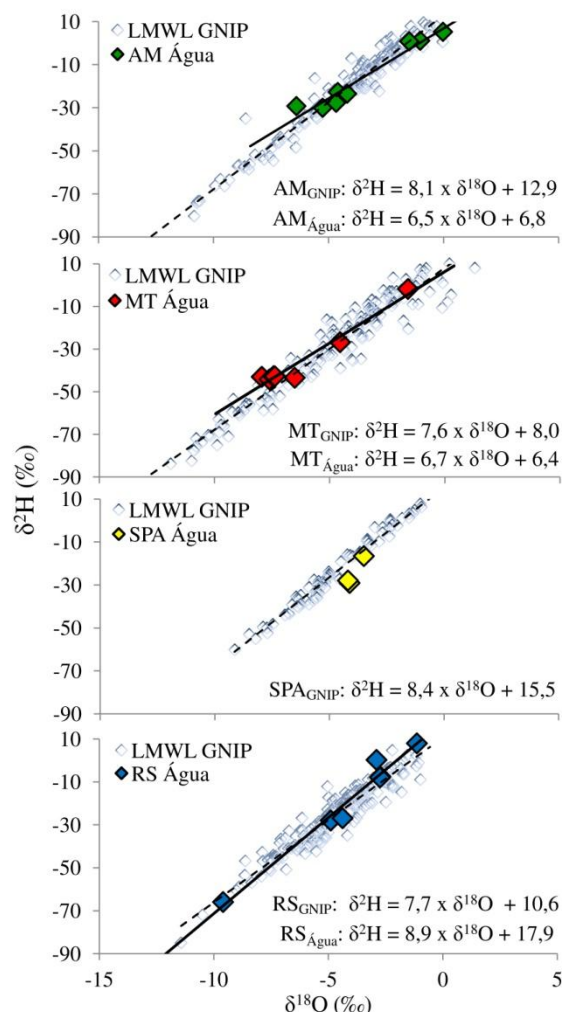


Figura 30. Linhas Locais da Água e comparação com dados de chuva do GNIP (LMWL_{GNIP}).

Eventos climáticos capazes de causar alterações nas razões isotópicas neste estudo, tais como o El Niño e La Niña, foram considerados. Estes eventos são perturbações do sistema oceano-atmosfera no Pacífico Tropical, caracterizados por temperaturas do oceano anormalmente quentes ou frias, respectivamente, no Pacífico Equatorial, e que têm consequências importantes para o clima ao redor do globo (NOAA, 2014a), incluindo mudanças na quantidade de chuva no Brasil, o que poderia afetar os padrões isotópicos na precipitação e influenciar os resultados obtidos neste estudo. A avaliação das razões isotópicas de oxigênio e hidrogênio das estações de referência do GNIP mostrou que a água da chuva se torna, geralmente, isotopicamente enriquecida em ambos os elementos durante episódios de El Niño, em comparação com períodos regulares, enquanto nenhuma forte tendência é observada durante

eventos de La Niña (Figura 31). Os dados do GNIP mostram que o La Niña tem pouco ou nenhum impacto sobre a assinatura isotópica. A campanha de amostragem de Novembro/2011, realizada durante tal evento, pode ser, portanto, avaliada sob as mesmas condições que as utilizadas para as outras campanhas, que ocorrem em períodos normais.

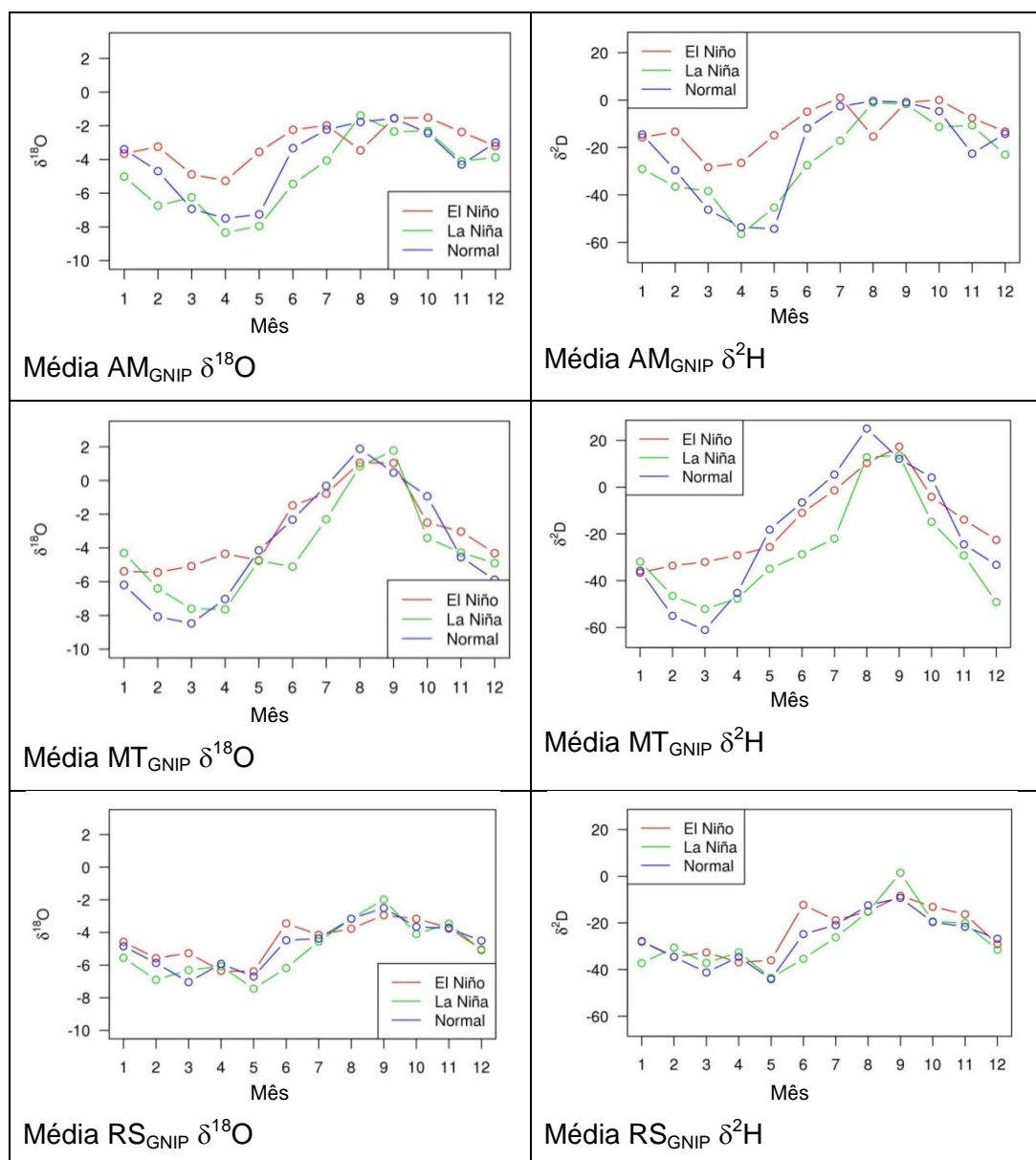


Figura 31. Avaliação da influência dos eventos El Niño e La Niña sobre as razões isotópicas de oxigênio e hidrogênio na precipitação (NOAA, 2014b). SPA não foi avaliada devido à indisponibilidade de dados.

8.3. Água da planta e água do solo

Em geral, as razões isotópicas de oxigênio e hidrogênio da água extraída de amostras de solo e planta apresentaram dispersões consideráveis (Tabela 24). A água da planta ficou na faixa de -9,98 a -1,54 ‰ para $\delta^{18}\text{O}$ e -82,15 a -8,81 ‰ para $\delta^2\text{H}$, enquanto de água do solo apresentou $\delta^{18}\text{O}$ na faixa de -12,09 a 3,89 ‰ e para $\delta^2\text{H}$ de - 83,71 a -1,78 ‰, todos relativos ao VSMOW. Apesar da variabilidade dos resultados na água da planta, a proximidade com a média ponderada na precipitação (Tabela 23), representando a assinatura isotópica na água subterrânea, reflete a conexão entre este compartimento, a água do solo e a água da planta, já que a água do solo – que recarrega a água subterrânea e é absorvida pelas raízes das plantas – é alimentada pela água de chuva. Em geral, os resultados de água-planta mais depletados tanto em ^{18}O quanto em D foram encontrados em amostras do MT, enquanto as amostras do RS apresentaram a menor variação. Tendo em mente a considerável variabilidade natural do sistema estudado, os resultados apontam para uma paridade razoável entre as razões isotópicas médias na água do solo (20-25 cm) e as respectivas razões na água da planta, enquanto isso não ocorre para a água do solo da camada superficial (0-5 cm). As diferenças entre a água planta e do solo em ambos os casos pode derivar de: (1) fracionamento devido à evaporação e/ou mistura da água da zona de vadosa com a água de chuvas recentes; (2) absorção, pela cana, de água de camadas mais profundas do solo, resultando em melhor reflexão da assinatura isotópica da água subterrânea. Estudos (ALLISON *et al.*, 1983; CLARK E FRITZ, 1997; MOREIRA *et al.*, 2000) sobre o fracionamento isotópico da água em diferentes profundidades do solo (Figura 32) mostram que os efeitos isotópicos cinéticos aumentam à medida que diminui de humidade do solo, de modo que um forte fracionamento pode ser esperado para amostras coletadas próximo à superfície, enquanto há uma tendência para a água na zona de vadosa para ser isotopicamente semelhante ao lençol freático. De fato, as amostras de água do solo de 0-5 cm forneceram resultados drasticamente enriquecidos em relação às amostras de solo coletadas na profundidade de 20-25 cm. Apesar de maior parte do sistema radicular da cana estar localizada perto da superfície (cerca de 63 % nos primeiros 30 cm), ele pode, eventualmente, atingir uma profundidade máxima de 1,5 a 2 m (SMITH *et al.*, 2005) (Figura 32).

Tabela 24. Resultados para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ na água da planta e água do solo

Informação de amostragem			$\delta^{18}\text{O}$ (‰)				$\delta^2\text{H}$ (‰)			
			Água do solo		Água da planta		Água do solo		Água da planta	
Local	Variedade da cana	Campanha	0-5 cm	20-25cm	OA-ICOS	WS-CRDS	0-5 cm	20-25 cm	OA-ICOS	WS-CRDS
AM	Desconhecida	Ago/2011	-	-	-5,35	-	-	-	-35,58	-
	Desconhecida	Nov/2011	-	-	-3,82	-	-	-	-24,07	-
	SP 813250	Out/2012	0,54	-1,88	-3,33	-3,04	-6,76	-13,97	-22,03	-18,69
	SP 791011	Out/2012	-1,99	-4,33	-2,64	-2,36	-9,46	-26,67	-17,53	-14,45
	RB 835486	Out/2012	-2,39	-4,10	-1,90	-1,98	-22,45	-32,26	-14,21	-12,79
	SP 813250	Nov/2012	-0,14	-1,61	-2,32	-	-1,38	-10,33	-12,38	-
	RB 835486	Nov/2012	0,15	-1,05	-2,16	-1,96	1,48	-6,74	-14,34	-12,78
		Média Nov/12	-0,77	-2,60	-2,47	-2,33	-7,71	-17,99	-16,10	-14,68
MT	Desconhecida	Ago/2011	-	-	-9,20	-	-	-	-68,94	-
	Desconhecida	Ago/2011	-	-	-9,53	-	-	-	-82,15	-
	Desconhecida	Ago/2011	-	-	-7,66	-	-	-	-58,93	-
	RB 867515	Ago/2011	-	-	-9,98	-	-	-	-77,04	-
		Média Ago/11	-	-	-9,09	-	-	-	-71,76	-

OA-ICOS: Analisador de água da Los Gatos Research; WS-CRDS: Analisador de água da Picarro Inc

Tabela 24. (cont. 1). Resultados para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ na água da planta e água do solo

Informação de amostragem			$\delta^{18}\text{O}$ (‰)				$\delta^2\text{H}$ (‰)			
			Água do solo		Água da planta		Água do solo		Água da planta	
Local	Variedade da cana	Campanha	0-5 cm	20-25cm	OA-ICOS	WS-CRDS	0-5 cm	20-25 cm	OA-ICOS	WS-CRDS
MT	RB 867515	Jul/2012	-	-	-8,47	-7,70	-	-	-55,70	-51,62
	RB 867515	Jul/2012	2,19	-3,92	-5,62	-5,48	-5,32	-22,58	-48,78	-45,85
	RB 928064	Jul/2012	0,73	-4,59	-8,66	-8,35	-6,65	-28,15	-66,63	-65,13
	RB 928064	Jul/2012	-0,98	-6,80	-6,81	-6,95	-11,95	-48,20	-55,20	-52,97
	RB 835486	Jul/2012	2,72	-8,64	-8,62	-7,83	-28,14	-67,99	-67,42	-64,57
	RB 9279	Jul/2012	-	-	-8,05	-7,71	-	-	-61,60	-59,50
		<i>Média Jul/12</i>	<i>1,17</i>	<i>-5,99</i>	<i>-7,71</i>	<i>-7,34</i>	<i>-13,01</i>	<i>-41,73</i>	<i>-59,22</i>	<i>-56,60</i>
MT	RB 928064	Out/2012	-2,12	-6,18	-1,54	-1,52	-25,49	-51,53	-20,32	-19,19
	SP 791011	Out/2012	-3,07	-6,81	-7,39	-7,54	-33,05	-54,91	-61,56	-59,11
	RB 867515	Out/2012	1,72	-0,20	-1,65	-1,45	-0,50	-2,91	-12,27	-9,14
	RB 867515	Out/2012	3,89	0,94	-7,14	-4,89	1,78	-13,57	-52,67	-45,42
	RB 835486	Out/2012	-2,87	-5,36	-3,03	-	-23,62	-33,93	-25,59	-
		<i>Média Out/12</i>	<i>-0,49</i>	<i>-3,52</i>	<i>-4,15</i>	<i>-3,85</i>	<i>-16,18</i>	<i>-31,37</i>	<i>-34,48</i>	<i>-33,21</i>

OA-ICOS: Analisador de água da Los Gatos Research; WS-CRDS: Analisador de água da Picarro Inc

Tabela 24. (cont. 2). Resultados para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ na água da planta e água do solo

Informação de amostragem			$\delta^{18}\text{O}$ (‰)				$\delta^2\text{H}$ (‰)			
			Água do solo		Água da planta		Água do solo		Água da planta	
Local	Variedade da cana	Campanha	0-5 cm	20-25cm	OA-ICOS	WS-CRDS	0-5 cm	20-25 cm	OA-ICOS	WS-CRDS
SPA	unknown	Ago/2011	-	-	-6,23	-	-	-	-33,37	-
	unknown	Nov/2011	-	-	-6,73	-	-	-	-30,93	-
	SP 813250	Ago/2012	-2,10	-6,69	-2,45	-3,03	-26,12	-44,00	-19,95	-19,70
	RB 867515	Ago/2012	0,02	-3,89	-3,97	-4,11	-16,46	-31,65	-27,53	-24,99
	RB 855156	Ago/2012	-1,63	-6,37	-2,48	-1,06	-18,40	-43,96	-22,98	-16,90
		Média Ago/12	-1,24	-5,65	-2,96	-2,73	-20,33	-39,87	-23,49	-20,53
RS	RB 855156	Ago/2011	-	-	-4,87	-	-	-	-31,11	-
	RB 855156	Nov/2011	-	-	-4,67	-	-	-	-32,51	-
	RB 855156	Jul/2012	-2,01	-5,75	-4,11	-2,84	-13,85	-47,90	-29,52	-22,97
	RB 867515	Jul/2012	-1,56	-3,98	-3,19	-3,54	-6,41	-27,97	-21,66	-18,39
	SP 813250	Jul/2012	-1,09	-4,74	-3,43	-3,75	-1,53	-37,18	-22,08	-19,48
		Média Jul/12	-1,55	-4,83	-3,58	-3,38	-7,26	-37,68	-24,42	-20,28
	SP 813250	Out/2012	-9,54	-9,48	-2,17	-2,26	-81,91	-72,98	-8,81	-7,94
	RB 855156	Out/2012	-12,09	-10,17	-4,73	-4,82	-83,71	-76,35	-31,89	-30,44
	RB 867515	Out/2012	-9,58	-9,10	-6,65	-6,33	-78,47	-65,14	-47,87	-45,84
		Média Out/12	-10,40	-9,58	-4,52	-4,47	-81,36	-71,49	-29,52	-28,07

OA-ICOS: Analisador de água da Los Gatos Research; WS-CRDS: Analisador de água da Picarro Inc.

Amazonas

Os resultados de água da planta para as campanhas de Agosto e Novembro/2011 no AM ($\delta^{18}\text{O} = -5,35 \text{ ‰}$, $\delta^2\text{H} = -35,58 \text{ ‰}$ e $\delta^{18}\text{O} = -3,82 \text{ ‰}$, $\delta^2\text{H} = -24,07 \text{ ‰}$, respectivamente; ver Tabela 24) foram consistentes com os de amostras de chuva local ($\delta^{18}\text{O} = -6,4 \text{ ‰}$, $\delta^2\text{H} = -29,2 \text{ ‰}$ e $\delta^{18}\text{O} = -4,64 \text{ ‰}$, $\delta^2\text{H} = -22,7 \text{ ‰}$, respectivamente; ver Tabela 23) e também com a assinatura isotópica da água subterrânea, representada pela média ponderada da precipitação anual ($\delta^{18}\text{O} = -5,15 \text{ ‰}$, $\delta^2\text{H} = -27,68 \text{ ‰}$, AM_{GNIP} ; ver Tabela 23). Contrastando com estes dados, a água da planta para a campanha de Outubro-Novembro/2012, foi a mais enriquecida (valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$: $-2,47 \text{ ‰}$ e $-16,10 \text{ ‰}$, respectivamente), com razões isotópicas entre as da água da chuva coletada no mesmo período (valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$: $-0,85 \text{ ‰}$ e $2,45 \text{ ‰}$, respectivamente, $n = 3$; ver Tabela 23) e as da água subterrânea (valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$: $-4,71 \text{ ‰}$ e $-27,01 \text{ ‰}$, respectivamente, $n = 3$; ver Tabela 23). Estes dados indicam que o canal absorveu ambas a chuva e a água subterrânea anteriormente a esta campanha de amostragem, resultando em uma assinatura isotópica correspondente à mistura de fontes.

Para a água do solo (campanhas de 2012) existem dois subconjuntos de padrões isotópicos nas amostras coletadas a 20-25 cm de profundidade, sugerindo uma maior contribuição das águas subterrâneas ($\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ valores médios $-4,21 \text{ ‰}$ e $-29,46 \text{ ‰}$, respectivamente, $n = 2$; ver Tabela 24) e a influência da água da chuva ($\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ valores médios $-1,51 \text{ ‰}$ e $-10,34 \text{ ‰}$, $n = 3$; ver Tabela 24). O gráfico de $\delta^{18}\text{O}$ *versus* $\delta^2\text{H}$ para a água da planta e para a água do solo (Figura 33) mostra perfis consistentes com os observados para a água meteórica (Figura 30) naquele local, embora a inclinação obtida seja um pouco menor do que a da $\text{LMWL}_{\text{GNIP}}$. Tal perfil é consistente com as observações descritas acima, e indica a existência de conexões robustas com o ciclo local da água, possivelmente devido aos elevados volumes de precipitação anual.

Mato Grosso

As águas da planta e do solo do MT foram as mais empobrecidas, conforme mostrado na Tabela 24. Este local está situado a 528 m de altitude e 275 km a noroeste da estação de referência MT_{GNIP} em Cuiabá (165 m de altitude), portanto, chuvas isotopicamente empobrecidas devem ser esperadas

em relação a Cuiabá, devido aos efeitos de altitude e continental (CLARK e FRITZ, 1997; KENDALL *et al.*, 2014; GONFIANTINI, *et al.*, 2001; ARAVENA *et al.*, 1999). No entanto, como o canavial não é irrigado e o local da amostra passa por uma estiagem severa durante todo o período de colheita, as únicas fontes importantes de água em Agosto/2011 e Julho/2012 foram a zona de vadosa e o freático. Os valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ encontrados para a água da planta (-9,09 ‰ e -71,76 ‰, respectivamente), em Agosto/2011 e em Julho/2012 (-7,71 ‰ e -59,22 ‰, respectivamente, ver Tabela 24 e Figura 32) diferem da assinatura isotópica prevista para a água subterrânea com base na média ponderada de precipitação anual ($\text{MT}_{\text{GNIP}}^{(*)}$, ver Tabela 23). De fato, os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ apresentaram-se realmente mais empobrecidos do que a estimativa para a água subterrânea feita com base nos dados históricos de precipitação do MT_{GNIP} no período de chuvoso que se estende de Novembro a Abril ($\text{MT}_{\text{GNIP}}^{(**)}$; ver Tabela 23 e Figura 26).

Apesar de o local de amostragem em Campo Novo do Parecis e a estação do GNIP em Cuiabá pertencerem a diferentes regiões hidrográficas (BRASIL, 2006a; FERREIRA, 2001), as razões isotópicas na água no ponto de captação da usina (MT Água 1; ver Tabela 23) não foram significativamente diferentes das da estimativa na água subterrânea do MT_{GNIP} entre Novembro e Abril. No entanto, os valores encontrados para a amostra MT Água 1 poderiam apresentar desvios devido ao enriquecimento evaporativo ao longo do curso do rio (EHLERINGER E DAWSON, 1992) ou durante o tempo de residência no reservatório grande e aberto onde foi coletada. Para uma investigação mais aprofundada sobre o perfil das águas superficial e subterrânea locais, uma amostragem complementar foi realizada em Setembro/2014. As amostras foram coletadas em cinco pontos: o reservatório da usina (mesmo ponto de amostragem da MT Água 1), o Rio do Sangue, o Rio Verde, e dois poços artesianos no interior das instalações da usina. Os novos dados foram concordantes com os da amostra MT Água 1 e confirmaram a assinatura isotópica local da água subterrânea, o período precoce de recarga, e a composição média de precipitação na bacia de drenagem. As diferenças observadas entre esses resultados e os de água da planta (Tabela 24) indicam que a zona de vadosa pode ser a fonte de água para a cultura de cana durante os períodos de seca em 2011 e 2012, ao invés de água subterrânea. O gráfico de $\delta^{18}\text{O}$ contra $\delta^2\text{H}$ para água da planta (Figura 33) mostra uma inclinação semelhante à obtida para MT_{GNIP} , demonstrando que o enriquecimento evaporativo não ocorre; portanto, a única conclusão possível é a ocorrência de

chuvas fortemente empobrecidas destes isótopos em Campo Novo do Parecis durante a estação chuvosa.

Outubro marca o início da estação chuvosa e do fim da safra na usina Coprodia. Os valores integrados de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ para a precipitação ao longo deste mês foram $-1,60\text{‰}$ e $-1,80\text{‰}$, respectivamente, confirmando o esperado alto enriquecimento causado pelo efeito isotópico da quantidade, o qual foi também registrado nos dados históricos para a estação de referência MT_{GNIP} (valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$: $-2,20\text{‰}$ e $-4,06\text{‰}$, respectivamente; ver Figura 26). As razões isotópicas na água da planta (Outubro/2012, Tabela 24) foram bastante variáveis, indicando uma mistura progressiva da nova umidade do solo, oriunda da água da chuva, com a água de vadosa antiga residual. Um enriquecimento isotópico da água da planta, atingindo valores médios para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ de $-4,15\text{‰}$ e $-34,48\text{‰}$, respectivamente, também é evidente. Um forte enriquecimento isotópico foi observado nas amostras de água do solo coletadas em 0-5 cm e 20-25 cm de profundidade (Tabela 24). O enriquecimento na camada superior indica incidência de processo evaporativo. Os gráficos de $\delta^{18}\text{O}$ versus $\delta^2\text{H}$ para a água da planta e a água do solo (Figura 33), apresentam perfis consistentes com os observados para a água meteórica local (Figura 30), com exceção da água do solo de 0-5 cm. Neste caso, a inclinação da regressão foi significativamente menor do que para LMW_{LGNI}P, confirmando um notável enriquecimento evaporativo na camada superior do solo.

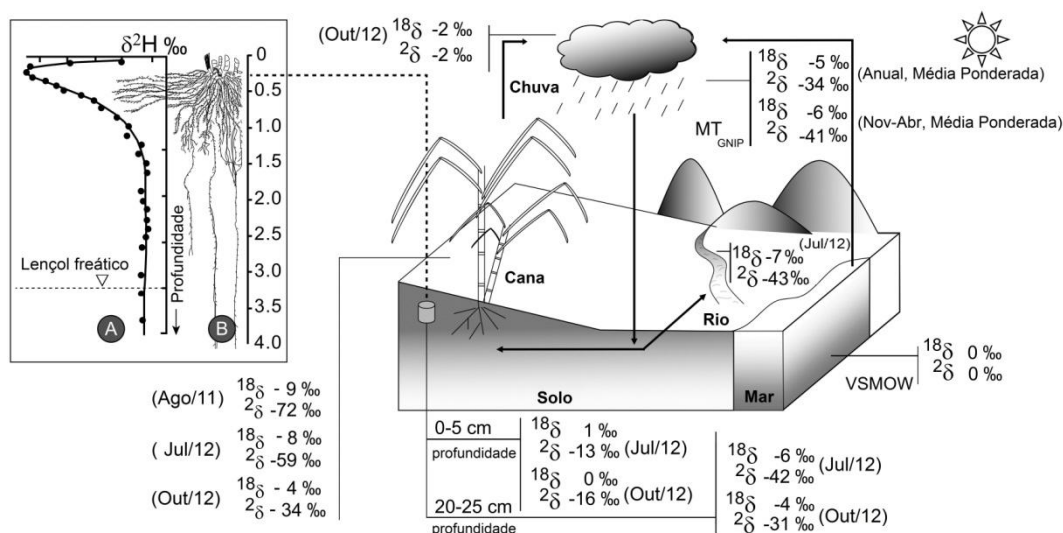


Figura 32. Representação gráfica dos resultados do Mato Grosso (MT) para água da chuva, de rio, da planta e do solo. No detalhe: descrição dos efeitos da seca observados neste local de amostragem, adaptado a partir de: A) Allison *et al.* (1983); Clark e Fritz (1997); e B) Smith *et al.* (2005).

São Paulo

Os resultados em SPA foram atípicos, pois apenas uma amostra de cana, coletada na campanha de Agosto/2011 (RB 867515, Tabela 24), apresentou resultados para água da planta consistentes com os das outras matrizes, como a respectiva água do solo (Tabela 24), e águas da lagoa de processo (SPA Água 1 e SPA Água 2, Tabela 23). Além disso, as duas amostras de solo restantes foram altamente empobrecidas, com valores médios para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ de -6,53 ‰ e -43,98 ‰, respectivamente. As inclinações consideravelmente pequenas das regressões lineares para ambas as águas da planta e do solo, em relação $\text{LMWL}_{\text{GNIP}}$, indicam um forte enriquecimento isotópico na área de SPA (Figura 33). As tendências isotópicas da água subterrânea naquela área (*isoscape* com $\delta^{18}\text{O} = -8 \text{ ‰}$ e $\delta^2\text{H} = -50 \text{ ‰}$; SRACEK E HIRATA, 2002) e os resultados de amostras de água mineral altamente empobrecidas (valores médios para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ de -8,00 ‰ e -54,54 ‰, respectivamente) coletadas em áreas com até 150 km de distância da usina (cidades de Águas de Santa Bárbara e Bauru; GODOY *et al.*, 2012) encaixaram-se bem quando interpolados na linha de regressão do $\text{LMWL}_{\text{GNIP}}$ (gráfico não apresentado). Estes resultados da literatura corroboram a assinatura isotópica prevista para essa locação do estudo, mas também destacam os deslocamentos isotópicos extraordinários obtidos para as amostras de SPA. Investigações mais aprofundadas precisam ser realizadas para compreender melhor os processos que levam a tais deslocamentos.

Rio Grande do Sul

No RS a água da planta apresentou os resultados mais constantes, com valores médios para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ de -4,22 ‰ e -28,18 ‰, respectivamente. Estes valores são consistentes com os da água do rio Uruguai obtidos em Julho e Novembro/2012 (RS Água 1 e RS Água 2; ver Tabela 23), com a média ponderada da precipitação anual ($\text{RS}_{\text{GNIP}}^{(*)}$, Tabela 23), e também com as tendências isotópicas da água subterrânea naquela área (*isoscape* com $\delta^{18}\text{O} -4,7 \text{ ‰}$ e $\delta^2\text{H} -29 \text{ ‰}$ (NANNI *et al.*, 2013). Estes resultados de água da planta não concordam com os das chuvas coletadas, uma vez que as quatro amostras de precipitação coletadas apresentaram deslocamentos isotópicos em uma ampla faixa de $\delta^{18}\text{O}$ (-1,13 a -9,6 ‰) e $\delta^2\text{H}$ (-0,3 a -65 ‰) (Tabela 23). A água do solo apresentou-se significativamente mais empobrecida do que a água

da planta (Tabela 24). Em Outubro/2012, os valores de ^{18}O e D da água do solo estavam fortemente empobrecidos em relação a Julho, sugerindo que um importante e recente evento de chuva levou ao deslocamento dos valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ para $-9,99 \text{ ‰}$ ($\pm 1,08 \text{ ‰}$) e $-76,43 \text{ ‰}$ ($\pm 6,73 \text{ ‰}$), respectivamente, em ambas as profundidades amostradas. A incidência do recente evento de chuva e seus efeitos sobre os resultados isotópicos da água do solo em Outubro/2012 são semelhantes ao observado em Novembro/2011 para a amostra RS Chuva 2 (Tabela 23), e também parecem ter impacto sobre as razões isotópicas na água da planta. O espalhamento dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ da água da planta sugerem uma absorção de água a partir de uma mistura de fontes, tais como o evento de chuva altamente empobrecido isotopicamente, a água da chuva coletada e a água subterrânea. As regressões lineares de $\delta^{18}\text{O}$ *versus* $\delta^2\text{H}$ para ambas as águas da planta e do solo (Figura 33) foram comparadas com a $\text{LMWL}_{\text{GNIP}}$ mostrando inclinações semelhantes e, portanto, reforçando estas conclusões.

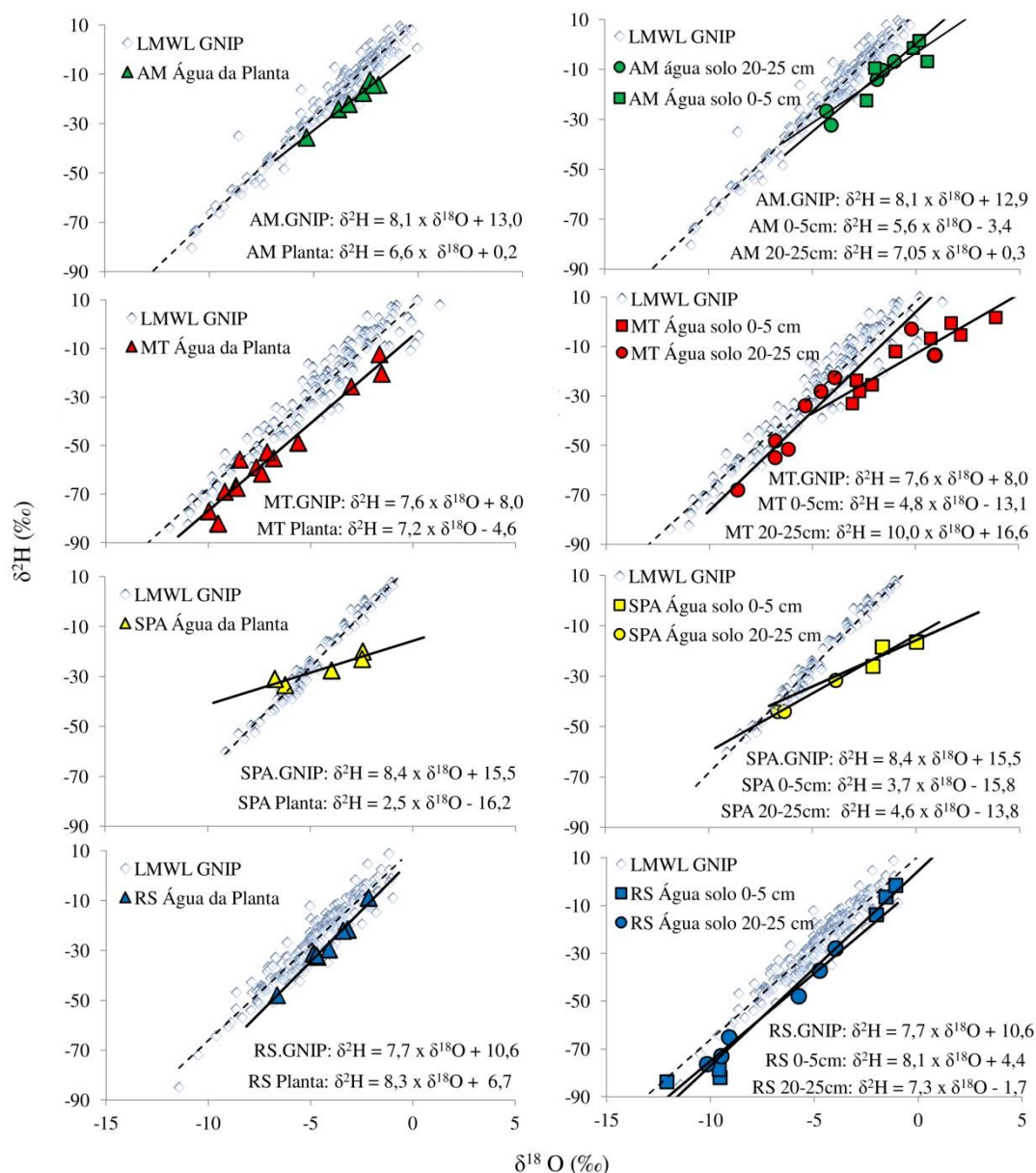


Figura 33. Linhas locais das águas do solo e da planta, e comparação com os dados de precipitação do GNIP (LMWL_{GNIP}).

8.4. Etanol e cana-de-açúcar

IRMS e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) são as duas principais técnicas analíticas utilizadas para a determinação de isótopos em etanol (GUILLOU E RENIERO, 2001) para avaliar a adulteração de bebidas. Neste trabalho, 21 amostras de etanol hidratado, anidro e neutro, coletadas durante as safras de 2011 e 2012 nas quatro usinas pesquisadas, foram analisadas para

determinação de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{13}\text{C}$ usando CF-IRMS. Os resultados ficaram na faixa de -216,1 a -186,9 ‰ para $\delta^2\text{H}$, e para $\delta^{13}\text{C}$, -13,24 a -12,04 ‰ (Tabela 25).

Tabela 25. Razões isotópicas médias (n=3) de hidrogênio e carbono para o etanol e a cana-de-açúcar.

Local da Usina	Safra	$\delta^2\text{H}_{\text{Etanol}}$ (‰)	DP (n=3)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Etanol}}$ (‰)	DP (n=3)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Cana}}$ (‰)	DP (n=3)
AM	Ago/2011	-200,3	3,9	-12,61	0,10	-13,04	0,05
	Nov/2011	-190,7	4,8	-12,31	0,01	-13,03	0,16
	Out/2012	-191,7	2,2	-12,42	0,00	-12,45	0,03
	Out/2012 (N)	-199,3	0,9	-13,24	0,12		
	Nov/2012	-199,8	1,7	-12,54	0,07	-12,74	0,06
	Nov/2012 (N)	-195,8	2,5	-12,63	0,16		
MT	Ago/2011	-216,1	3,4	-12,55	0,06	-12,78	0,06
	Jul/2012	-203,2	1,8	-12,25	0,08	-12,06	0,09
	Out/2012	-188,8	1,5	-12,04	0,09	-12,69	0,07
	Out/2012 (A)	-190,0	0,3	-12,53	0,08		
	Nov/2012	-186,9	1,6	-12,23	0,11	-	-
SPA	Ago/2011	-203,3	1,0	-12,32	0,10	-12,22	0,11
	Nov/2011	-199,7	3,0	-12,63	0,05	-13,24	0,09
	Ago/2012	-196,7	2,6	-12,40	0,03	-12,25	0,09
RS	Ago/2011	-207,7	0,9	-12,31	0,15	-13,13	0,00
	Nov/2011	-208,0	1,6	-12,34	0,15	-13,25	0,08
	Jul/2012	-197,1	3,5	-13,00	0,04	-13,05	0,08
	Out/2012	-195,9	1,0	-12,62	0,08	-12,96	0,08

AM: Amazonas; MT: Mato Grosso; RS: Rio Grande do Sul; SPA: São Paulo.
A= Etanol anidro; N= Etanol Neutro. Resultados correspondem a réplicas de injeção.

A comparação dos valores de $\delta^2\text{H}$ para as amostras de etanol com os obtidos para a água extraída de plantas dos canaviais utilizados nas respectivas usinas (Tabela 24, Tabela 25 e Figura 34) revelou tendências gerais semelhantes, mostrando que independentemente da especificação do etanol (hidratado, etanol anidro ou neutro) o $\delta^2\text{H}$ é fortemente influenciado pela razão isotópica da água da planta e, conseqüentemente, pelas flutuações isotópicas inerentes ao ciclo da água. Na verdade isso deveria ser esperado uma vez que

os átomos de hidrogênio do grupo metileno etanol derivam de água presente no meio fermentativo, composto basicamente de água da planta (MARTIN *et al.*, 1982; MARTIN *et al.*, 1983; MARTIN *et al.*, 1986; SAUR *et al.*, 1968a; SAUR *et al.*, 1968b; PIONNIER *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 1995).

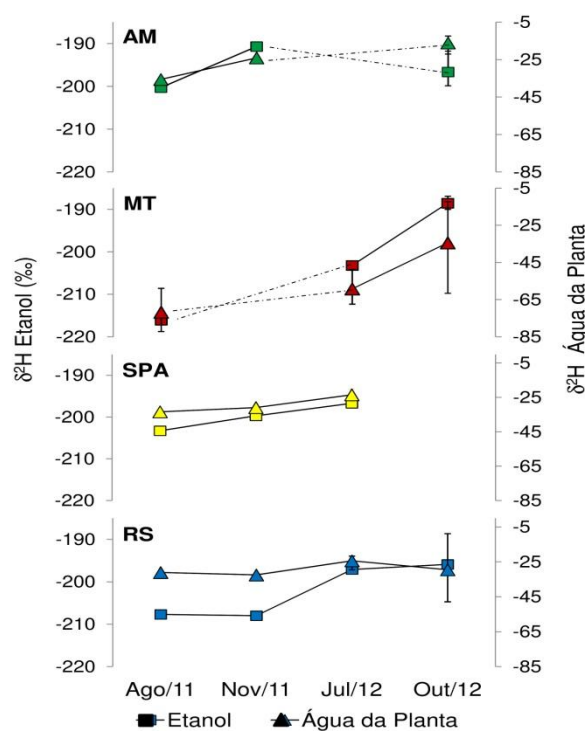


Figura 34. Comparação de $\delta^2\text{H}$ para o etanol e para a água da planta.

A aplicação de ANOVA para os resultados de $\delta^2\text{H}$ da safra de 2011 mostrou que amostras de etanol produzidas nas quatro usinas estudadas são estatisticamente diferentes. No entanto, para a safra de 2012 apenas o biocombustível produzido no MT é estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$). Para os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ ocorreu o oposto, pois na safra de 2011 não houve diferença significativa nas assinaturas isotópicas, enquanto a amostra do MT em 2012 foi significativamente diferente (Figura 35).

Amostras de etanol do MT mostraram-se fortemente enriquecidas em deutério de Julho a Outubro/2012 (Tabela 25), como foi também observado para a água extraída da cana (Tabela 24). O período chuvoso começa em Outubro, e a água da chuva coletada durante este mês inteiro também mostrou grande enriquecimento em deutério (Tabela 23 e Tabela 25).

Açúcar e fibras estão presentes em proporção equivalente na cana-de-açúcar, com respectivos teores de 10 a 17 % e 8 a 14 % (BNDES, 2014). A

comparação das razões isotópicas de carbono nos talos de cana com as no etanol (Tabela 25) revela uma tendência irrelevante para o empobrecimento de ^{13}C na cana-de-açúcar, confirmando que o processo fermentativo não causa um fracionamento isotópico importante do carbono durante a produção do etanol (HOBIE E WERNER, 2004).

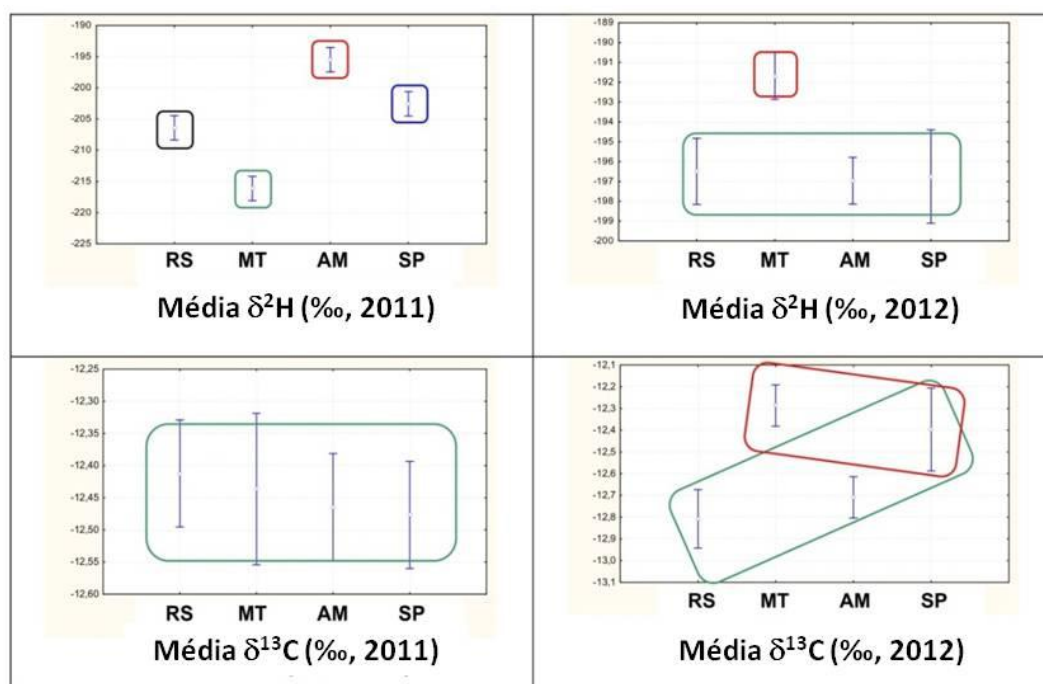


Figura 35. Representação gráfica dos grupos homogêneos da ANOVA obtidos para 21 amostras de etanol coletadas em quatro regiões geográficas do Brasil.

Um estudo recente avaliou (COSTINEL *et al.*, 2011) a influência da variedade da uva sobre as razões isotópicas de carbono, oxigênio e hidrogênio do etanol presente nos vinhos produzidos em diferentes partes da Itália. A conexão entre a variedade de cana e as razões isotópicas na água da planta e no etanol foi avaliada, mas nenhuma relação clara foi detectada, indicando que, para uma avaliação adequada, é necessário um profundo conhecimento de fatores ambientais, como as fontes de chuva e de água. No caso do bioetanol brasileiro, além do impacto não linear de factores ambientais, a utilização de várias variedades de cana, continuamente alternadas intra e inter usinas durante a safra, dificulta associações.

9

Conclusões para água e etanol

Em geral, as amostras de água superficial, coletadas em usinas de cana-de-açúcar e canaviais não irrigados nas proximidades, nas quatro localidades estudadas refletiram as médias ponderadas das razões isotópicas na chuva anual e, conseqüentemente, a assinatura isotópica na água subterrânea. Para a água da planta, as maiores depleções de ^{18}O e D foram encontradas em amostras MT durante o período de seca que ocorre no meio do ano. Foi evidenciado que a zona de vadosa, ao invés da água subterrânea, é a fonte de água para o canavial naquele local, posto que estas são as únicas fontes disponíveis e os resultados para água subterrânea divergem dos encontrados para água da planta. Os deslocamentos isotópicos para o RS não variaram muito ao longo do período de observação no presente estudo, ficando praticamente constantes nas quatro amostragens entre 2011 e 2012. As razões isotópicas para amostras do AM mostraram uma robusta conexão com o ciclo local da água, indicando que a água da chuva neste lugar é a principal fonte de água para o solo e a plantação. Os resultados de SPA mostraram baixa correlação entre as diferentes matrizes avaliadas, revelando também um inesperado enriquecimento para ambas as águas da planta e do solo, quando comparados com a linha meteórica local da água. Os resultados para a água do solo foram considerados em boa concordância com os da respectiva água da planta para a profundidade de 20-25 cm.

Uma variação sazonal semelhante para os valores de $\delta^2\text{H}$ em etanol e água da planta seria esperada, devido à: 1) troca de hidrogênios durante a produção e 2) resultados na planta da água refletindo a média ponderada das razões isotópicas na precipitação anual. Este fato destaca a influência do ciclo hidrológico nas razões isotópicas de hidrogênio no álcool. Um padrão regional foi encontrado somente para as amostras do MT, uma vez que a avaliação estatística (ANOVA) de $\delta^2\text{H}$ não indicou distinção entre os três locais de amostragem restantes, em ambas as safras. Quanto aos resultados de $\delta^{13}\text{C}$, a ANOVA agrupou todos os quatro locais como um grupo homogêneo único em 2011. Os resultados do presente estudo apontaram que o uso de razões

isotópicas de hidrogênio e de carbono para determinação da origem geográfica de etanol no Brasil representa um grande desafio, pois, no caso do hidrogênio, as variações sazonais das razões isotópicas de hidrogênio dos reservatórios de água, impostas pelo ciclo hídrico, afetam diretamente a produção de etanol causando superposições dos valores regionais de $\delta^2\text{H}$. Quanto ao carbono, foi observada também uma homogeneidade dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ nos locais avaliados, o que também inviabiliza a comparação visando a diferenciação de origem geográfica.

10

Conclusões gerais e recomendações

Gasolina:

- A metodologia para Análise Isotópica de Compostos Específicos (CSIA, na sigla em inglês) para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ em tolueno, etilbenzeno, m-xileno e o-xileno por HS-IRMS foi Implantada com sucesso;
- Para padronização dos BTEX, foi desenvolvida uma nova técnica de introdução dos padrões puros no analisador elementar (EA-IRMS) para análise de $\delta^2\text{H}$, sem fracionamento isotópico, utilizando amostrador de sólidos e carvão ativo como suporte;
- Foram caracterizadas ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$) 28 amostras de gasolina produzidas de 12 refinarias de petróleo, codificadas de R01 a R12. Análises de Variância dos resultados de $\delta^2\text{H}$ mostraram: **A)** razões isotópicas de hidrogênio específicas para seis refinarias: R02, R03, R05 R06, R07 e R12; **B)** Distribuição de razões isotópicas semelhantes para R01 e R11; **C)** Distribuição de razões isotópicas semelhantes para R04, R08, R09 e R10. Estes resultados indicam a viabilidade de diferenciar gasolinas através de suas características isotópicas.
- Recomendações para possíveis desdobramentos:
 - * Aumentar a frequência de amostragem;
 - * Aumentar o número de amostras;
 - * Montar um banco de dados dos resultados;
 - * Mapear as razões isotópicas das carga dos petróleos nas refinarias;
 - * Monitorar as correntes a partir do processo de FCC.

Etanol

- A metodologia de análise isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ em etanol por HS/CF-IRMS foi implantada com sucesso, sendo aplicada na análise de 21 amostras de etanol hidratado, anidro e neutro, coletadas nas usinas pesquisadas em estados do Brasil;

- Para padronização do etanol, foi desenvolvida uma nova técnica de introdução do etanol no analisador elementar (EA-IRMS) para análise de $\delta^2\text{H}$ sem fracionamento isotópico, utilizando amostrador de sólidos e carvão ativo como suporte;
- As razões isotópicas de hidrogênio e oxigênio da água presente na cana-de-açúcar, bem como no solo, rios, lagos, chuva e água subterrânea, foram também investigadas, utilizando a técnica de Espectroscopia de Infravermelho de Razão Isotópica (IRIS, na sigla em inglês), devido à troca de hidrogênios entre o etanol e a água da planta durante o processo fermentativo;
- Apesar do sucesso na implantação do método analítico, o uso de razões isotópicas de hidrogênio e de carbono para determinação da origem geográfica de etanol no Brasil não foi possível devido às grandes variações no $\delta^2\text{H}$ impostas pelo ciclo hídrológico, que afetam diretamente a produção de etanol, e à homogeneidade do $\delta^{13}\text{C}$ nos locais avaliados.
- Recomendações para desdobramentos:
 - * Aumentar a frequência de amostragem;
 - * Aumentar o número de amostras;
 - * Realizar mais campanhas em safras diferentes;
 - * Incluir usinas do nordeste, cuja safra ocorre em outro período do ano;
 - * Montar um banco de dados dos resultados.

11

Referências bibliográficas

ADAMI, L.; DUTRA, S. V.; MARCON, A. R.; CARNIELI, G. J.; ROANI, C. A.; VANDERLINDE, R. Geographic origin of southern Brazilian wines by carbon and oxygen isotope analyses. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 2943-2948. 2010.

AGUILAR-CISNEROS, B. O.; LÓPEZ M. G., RICHLING E.; HECKEL F.; SCHREIER P. Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of ethanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7520-7523. 2002.

ALLISON, G. B., BARNES, C. J.; HUGHES, M. W. The distribution of deuterium and ^{18}O in dry soil. Experimental. **Journal of Hydrology**, v. 64, p. 377-379. 1983.

ANP 2009. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Esquemas de produção no refino de petróleo**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=7854&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1274970551849>>, Atualizado em 15/09/2009. Acesso em: 27 mai. 2010.

ARAVENA, R., SUZUKI, O., PENA, H., POLLASTRI, A., FUENZALIDA, H., AND GRILLI, A. Isotopic composition and origin of the precipitation in Northern Chile. **Applied Geochemistry**, v. 14, p. 411-422. 1999.

AVIDAN, A. A. Origin, Development and Scope of FCC Catalysis. In: Magee, J.S.; Mitchel Jr., M.M. (eds.). **Fluid Catalytic Cracking: Science and Technology – v. 76: Studies in Surface Science and Catalysis**. Ed. Elsevier, Nova Iorque, 605 p. 1993. p. 1-39. ISBN: 978-0-444-89037-5. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/49142942/0444890378-Fluid-Catalytic-Cracking>. Acesso em: 14 dez. 2013.

BARBOSA, M. H. P.; RESENDE, M. D. V.; DIAS, L. A. S.; BARBOSA, G. V. S.; OLIVEIRA, R. A.; PETERNELLI, L. A.; DAROS, E. Genetic improvement of sugar cane for bioenergy: the Brazilian experience in network research with RIDESA. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. S2, p. 87-98. 2012.

BENSON, S.; LENNARD, C.; MAYNARD, P.; ROUX, C. Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry - A review. **Forensic Science International**, v. 157, p. 1-22. 2006.

BNDES - Banco Nacional De Desenvolvimento Econômico E Social. **Sugarcane-based bioethanol: energy for sustainable development**. Ccoordination BNDES and CGEE (Centro de Gestão e Estudos Estratégicos). Rio de Janeiro, 2008, 304 p. ISBN: 978-85-87545-27-5. Disponível em: <<http://www.sugarcanebioethanol.org>>. Acesso em: 01 set. 2014.

BLESSING, M.; JOCHMANN, M. A.; SCHMIDT, T. C. Pitfalls in compound-specific isotope analysis of environmental samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 591-603. 2008. DOI 10.1007/s00216-007-1588-1.

BOUCHARD, D.; HUNKELER, D.; HÖHENER, P.; ARAVENA, R.; BROHOLM, M.; KJELDSSEN, P. Use of stable isotope analysis to assess biodegradation of petroleum hydrocarbons in the unsaturated zone. Laboratory studies, field studies, and mathematical simulations. In: NÜTZMANN, G.; VIOTTI, P.; AAGAARD, P. (Eds.). **Reactive transport in soil and groundwater**. Berlin: Springer. 2005. 298p.

BRAND, W. A.; GEILMANN, H.; CROSSON, E. R.; RELLA, C. W., Cavity ring-down spectroscopy versus high-temperature conversion isotope ratio mass spectrometry; a case study on d^2H and $d^{18}O$ of pure water samples and alcohol/water mixtures. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1879-1884. 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Recursos Hídricos. **Caderno da região hidrográfica Amazônica**. Brasília, 2006a. 128p. ISBN 85-7738-065-3.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Recursos Hídricos. **Caderno da região hidrográfica do Paraná**. Brasília, 2006b, 240p. ISBN 85-7738-063-7.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Recursos Hídricos. **Caderno da região hidrográfica do Uruguai**. Brasília, 2006c. 128p. ISBN 85-7738-067-X.

BRENNAN, J. T.; CORSO, T. N.; TOBIAS, H. J.; CAIMI, R. J. High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 16, p. 227-258. 1997.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, 2004, 307 p.

CETESB. **Relação de áreas contaminadas - Novembro de 2009**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_09_.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2010.

COSTINEL, D.; TUDORACHE, A.; BONETE, R. E.; VREMERA, R., The Impact of Grape Varieties to Wine Isotopic Characterization. **Analytical Letters**, v. 44, p. 2856-2864. 2011.

CLARK, I. D.; FRITZ, P. **Environmental Isotopes in Hydrogeology**. New York: CRC Press, 1997. 352p. ISBN 1566702496, 9781566702492

CRAIG, H. Isotopic variations in meteoric waters. **Science**, v. 133, p. 1702-1703. 1961.

DIAS, P. L. S. AND MARENGO, J. A., Águas atmosféricas, chap. 3. p. 65-117. ____ In: Rebouças, A. C.; Braga, B.; Tundisi, J. G. (Eds.). **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**, 2.ed. São Paulo: Escrituras, 2002. 703 p.

DIAS, R. F. AND FREEMAN, K. H. Carbon isotope analyses of semivolatile organic compounds in aqueous media using solid-phase microextraction and isotope ratio monitoring GC/MS. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 944-950. 1997.

DUTRA, S. V.; ADAMI, L.; MARCON, A. R.; CARNIELI, G. J.; ROANI, C. A.; SPINELLI, F. R.; LEONARDELLI, S.; DUCATTI, C.; MOREIRA, M. Z.; VANDERLINDE, R. Determination of the geographical origin of Brazilian wines by isotope and mineral analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1575-1580. 2011. DOI: 10.1007/s00216-011-5181-2.

EHLERINGER, J. R.; DAWSON, T. E. Water uptake by plants: perspectives from stable isotope composition. **Plant, Cell & Environment**, v. 15, p. 1073-1082. 1992.

EHLERINGER, J. R.; RODEN, J.; DAWSON, T. E. Assessing ecosystem-level water relations through stable isotope ratio analyses. In: SALA, O.; JACKSON, R.; MOONEY, H. A.; HOWARTH, R. (Eds.). **Methods in ecosystem science**. Nova Iorque: Springer, 2000. p. 181-198. DOI: 10.1007/978-1-4612-1224-9_13.

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

FERREIRA, A. A. **Distribuição isotópica de hidrogênio em n-alcanos, isoprenoides e biomarcadores isolados de óleos e extratos orgânicos, e comparação de métodos de determinação de $\delta^2\text{H}$ de águas de formação da Bacia Potiguar, Brasil**. Rio de Janeiro, 2012. 290p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FERREIRA, J. C. V. **Mato Grosso e seus municípios**. Secretaria de Estado da Educação. Cuiabá: Buriti, 2001. 660p.

FGV – Fundação Getúlio Vargas. **Plano Nacional de Recursos Hídricos**. Proposta elaborada para o Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, de acordo com o Contrato Administrativo Nº 003/96. [S.l.]: 1998.

FREITAS, J. G.; FLETCHER, B.; ARAVENA, R.; BARKER, J. F. Methane Production and Isotopic Fingerprinting in Ethanol Fuel Contaminated Sites. **Groundwater**, v. 48, p. 844-857. 2010.

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, p. 6661-6669. 2011.

GILBERT, A.; YAMADA, K.; YOSHIDA, N. Accurate Method for the Determination of Intramolecular ^{13}C Isotope Composition of Ethanol from Aqueous Solutions. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 6566–6570. 2013. DOI: 10.1021/ac401021p.

GODOY, J. M. G.; GODOY, M. L. D. P.; NETO, A. Direct determination of δ (D) and δ (^{18}O) in water samples using cavity ring down spectrometry: Application to bottled mineral water. **Journal of Geochemical Exploration**. v. 119-120, p. 1-5, 2012.

GONFIANTINI, R.; ROCHE, M. A.; OLIVRY, J. C.; FONTES, J. C.; ZUPPI, G. M. The altitude effect on the isotopic composition of tropical rains. **Chemical Geology**, v. 181, p. 147-167. 2001.

GÓRECKI, T.; YU, X.; PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. **Analyst**, v. 124, p. 643-649. 1999.

GRICE, K; MESMAY, R; GLUCINA, A; WANG, S. An improved and rapid 5A molecular sieve method for gas chromatography isotope ratio mass spectrometry of n-alkanes (C8-C30+). **Organic Geochemistry**, v. 39, p. 284-288. 2008.

GUILLOU, C.; RENIERO, F. Isotope methods for the control of food products and beverages. In: **Technical Document IAEA-TECDOC-1247**, International Atomic Energy Agency, Vienna, p. 39-53. 2001.

HOBIE, E. A. AND WERNER, R. A. Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C3 and C4 plants: a review and synthesis. **New Phytologist**, v. 161, p. 371-385. 2004.

HOEFS, J. **Stable Isotope Geochemistry**. 6.ed. Berlin: Springer, 2009. 285 p.

HUNKELER, D.; BUTLER, B. J.; ARAVENA, R.; BARKER, J. F. Monitoring biodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) using compound-specific carbon isotope analysis. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 676-681, 2001.

HUNKELER, D.; MECKENSTOCK, R. U.; LOLLAR, B. S.; SCHMIDT, T. C.; WILSON, J. T. **A Guide for Assessing Biodegradation and Source Identification of Organic Ground Water Contaminants Using Compound Specific Isotope Analysis (CSIA)**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/R-08/148, 2008, 67p.

IAEA/WMO. **Global Network of Isotopes in Precipitation**. The GNIP Database. 2014. Disponível em: <<http://www.iaea.org/water>>.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. **Normais Climatológicas do Brasil 1961-1990. Precipitação Acumulada Mensal e Anual (mm)**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/webcdp/climatologia/normais>>. Acesso em: 14 jan. 2014.

ISHIDA-FUJII, K.; GOTO, S.; UEMURA, R.; YAMADA, K.; SATO, M.; YOSHIDA, N. Botanical and Geographical Origin Identification of Industrial Ethanol by Stable Isotope Analyses of C, H, and O. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, p. 2193-2199. 2005.

JAMIN, E.; GUÉRIN, R.; RÉTIF, M.; LEES, M.; MARTIN, G.J. Improved detection of added water in orange juice by simultaneous determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of water and ethanol derived from sugars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5202-5206. 2003.

JOCHMANN, M. A., M. BLESSING, S. B. HADERLEIN AND T. C. SCHMIDT. A new approach to determine method detection limits for compound specific isotope analysis of volatile organic carbons. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 3639-3648. 2006.

KARLSSON, H. R. The Use of Molecular Sieves in Stable Isotope Analysis. In: DE GROOT, P.A. (Ed.), **Handbook of Stable Isotope Analytical Chemistry**, v. I, cap. 36. Amsterdam: Elsevier, 2004, p. 805-819.

KENDALL, C., DOCTOR, D.H., AND YOUNG, M.B. Environmental Isotope Applications in Hydrologic Studies. In: HOLLAND, H. AND TUREKIAN, K. (Eds.), **Treatise on Geochemistry. 2.ed., v. 7: Surface and Groundwater, Weathering and Soils.** Elsevier, p. 273-327. 2014. ISBN: 978-0-08-098300-4.

KUDER, T.; WILSON, J. T.; KAISER, P.; KOLHATKAR, R.; PHILP, P.; ALLEN, J. Enrichment of stable carbon and hydrogen isotopes during anaerobic biodegradation of MTBE: microcosm and field evidence. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 213-220. 2005.

KURITA, N.; ICHIYANAGI, K.; MATSUMOTO, J.; YAMANAKA, M. D.; OHATA, T. The relationship between the isotopic content of precipitation and the precipitation amount in tropical regions. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 102, p. 113-122. 2009.

LEEN, J. B.; BERMAN, E. S. F.; LIEBSON, L.; GUPTA, M. Spectral contaminant identifier for off-axis integrated cavity output spectroscopy measurements of liquid water isotopes. **Review of Scientific Instruments**, v. 83, p. 044305. 2012.

LOPES, M. C.; SALES, P. C.; FERRAZ, J. Estoques de carbono em solos de áreas degradadas e reflorestadas com espécies nativas na Amazônia Central. In: **Simpósio Nacional Sobre Recuperação de Áreas Degradadas**, 5., 2002, Belo Horizonte. Água e biodiversidade: trabalhos voluntários. Belo Horizonte: SOBRADE, 2002, 240 p.

MARTIN, G. J.; MARTIN, M. L.; MABON, F.; MICHON, M. J., Identification of the origin of natural alcohols by natural abundance hydrogen-2 nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, v. 54, p. 2380-2382. 1982.

MARTIN, G. J.; ZHANG, B.; L.; MARTIN, M. L.; DUPUY, P., Application of quantitative deuterium NMR to the study of isotope fractionation in the conversion of saccharides to ethanol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 111, p. 890-896. 1983.

MARTIN, G. J.; ZHANG, B. L.; NAULET, N.; MARTIN, M. L., Deuterium transfer in the bioconversion of glucose to ethanol studied by specific isotope labeling at the natural abundance level. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, p. 5122-5127. 1986.

MARTINELLI, L. A.; OMETTO, J. P. H. B.; FERRAZ, E. S.; VICTORIA, R. L.; CAMARGO, P. B; MOREIRA, M. Z. **Desvendando Questões Ambientais com Isótopos Estáveis**. São Paulo: Oficina de Textos, 2009. 144 p. ISBN: 9788586238857.

MATO GROSSO. Relatório de Monitoramento da Qualidade da Água da Região Hidrográfica Amazônica: 2007 a 2009. Secretaria de Estado do Meio Ambiente - SEMA/SMIA. Mato Grosso, 2010. 90 p.

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

MILLER, J .C.; MILLER J. N., **Statistics for Analytical Chemistry**. 2.ed., Nova Iorque: Halsted Press, 1989. 227p. ISBN 0-470-20902-X.

MONETTI, A.; RENIERO, F.; VERSINI, G. Interregional and interannual variability of ethanol site-specific deuterium content in Italian wines. **Z. Lebensm Unters Forsch**, v. 199, p. 311-316. 1994.

MONSALLIER-BITEA, C.; JAMIN, E.; LEES, M.; ZHANG, B. L.; MARTIN, G. J. Study of the influence of alcoholic fermentation and distillation on the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratio of ethanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 279-284. 2006.

MORAES, M. A. F. D. Considerações sobre a indústria do etanol. In: MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES. (Org.). **Biocombustíveis: Realidade E Perspectivas**. 1.ed. Brasília: Ministério das Relações Exteriores, v. 1, p. 137-157. 2007.

MOREIRA, M. Z.; STERNBERG, L. S. L.; NEPSTAD, D. C. Vertical Patterns of Soil Water Uptake by Plants in a Primary Forest and an Abandoned Pasture in the Eastern Amazon: An Isotopic Approach. **Plant and Soil**, v. 222, p. 95-107, 2000.

MOTA, C. J. A.; RAWET, R. Mechanism of Aromatic Hydrocarbon Formation in FCC Naphtha. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 34, p. 4326-4332. 1996. DOI: 10.1021/ie00039a024.

NANNI, A. S.; ROISENBERG, A.; DE HOLLANDA, M. H. B. M.; MARIMON, M. P, C.; VIERO, A. P. Fluoride in the Serra Geral Aquifer System: Source Evaluation Using Stable Isotopes and Principal Component Analysis. **Journal of Geological Research**, Article ID 309638, 9 p. 2013. doi:10.1155/2013/309638.

NETO, R. A. P. E CUNHA, R. B. C. O programa brasileiro de biocombustíveis e as tendências para o futuro. **Espaço Energia**, v. 08, p. 1-9. 2008. ISSN: 1807-8575.

NIER, A. O.; GULBRANSEN, E.A. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 61, p. 697-698. 1939.

NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration. **NOAA's El Niño Portal**. Disponível em <<http://www.elnino.noaa.gov>>. Acesso em: 11 jan. 2014a

_____. National Weather Service/Climate Prediction Center Internet Team. Cold & Warm Episodes by Season. Disponível em: <www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml>. Acesso em 11 jan. 2014b.

O'LEARY, M. H. Carbon isotope fractionation in plants. **Phytochemistry**, V. 20, p. 553-667. 1981.

O'MALLEY, V. P.; ABRAJANO JR, T. A.; HELLOU, J. Determination of the ¹³C/¹²C ratios of individual PAH from environmental samples: can PAH sources be apportioned? **Organic Geochemistry**, v. 21, p. 809-822. 1994.

PALAU, J.; SOLER, A.; TEIXIDOR, P.; ARAVENA, R. Compound-specific carbon isotope analysis of volatile organic compounds in water using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, p. 260-268. 2007.

PHILP, R. P. The emergence of stable isotopes in environmental and forensic geochemistry studies: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 5: 57-66, 2007.

PHILP, R. P.; KUDER, T. Chapter 4 - Biomarkers and Stable isotopes in environmental Forensic Studies. In: MUDGE, S. M. (Ed.). **Methods in Environmental Forensics**. CRC Press, 2008, 386 p.

PIONNIER, S.; ROBINS, R. J.; ZHANG, B. L., Natural abundance hydrogen isotope affiliation between the reactants and the products in glucose fermentation with yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2076-2082. 2003.

PISSINATTO, L.; MARTINELLI L. A.; VICTORIA, R. L.; CAMARGO, P. B. Stable carbon isotopic analysis and the botanical origin of ethanol in Brazilian brandies. **Food Research International**, v. 32, p. 665-668. 1999.

REGO, E .C. P.; NETTO, A. D. P. PAHs and BTEX in Groundwater of Gasoline Stations from Rio de Janeiro City, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, p. 660-664. 2007.

SANTOS, L. P.; BRAGANÇA, S. M.; SILVA, E. B.; MARTINS, G. C.; FONTES, J. R. A.; FREGONEZI, F. R. Dinâmica de nutrientes e atributos químicos do perfil do solo em função da aplicação de calcário na cultura de guaranazeiro em formação no estado do Amazonas. Anais do XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE, 2009. In: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Relatório: **Atividades de pesquisa desenvolvidas na agropecuária Jayoro LTDA no período 2007 a 2013, mediante contrato de cooperação técnico-científica e financeira celebrado entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA e a Agropecuária Jayoro LTDA - Jayoro**. EMBRAPA Amazônia Ocidental - CPAA. Manaus, 06/08/2013. Disponível em: <http://webftp.cpa.embrapa.br/Relatorio_final_Jayoro_2013.pdf>. Acesso em 27 set. 2013.

SAUR, W. K.; CRESPI, H. L.; HALEVI, E. A.; KATZ, J. J., Deuterium isotope effects in the fermentation of hexoses to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. I. Hydrogen exchange in the glycolytic pathway. **Biochemistry**, v. 7, p. 3529-3536. 1968a.

SAUR, W. K.; PETERSON, D. T.; HALEVI, E. A.; CRESPI, H. L.; KATZ, J. J., Deuterium isotope effects in the fermentation of hexoses to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. II. A steady-state kinetic analysis of the isotopic composition of the methyl group of ethanol in an isotopic mirror fermentation experiment. **Biochemistry**, v. 7, p. 3537-3546. 1968b.

SCHERZER, J. Correlation Between Catalyst Formulation and Catalytic Properties. Cap. 5, pp 145-182. In: MAGEE, J.S.; MITCHEL JR., M.M. (Eds). **Studies in Surface Science and Catalysis**. Vol. 76 - Fluid Catalytic Cracking: Science and Technology. Ed. Elsevier, Amsterdam, Londres, Nova Iorque, Tokio, 1993. 605 p. ISBN: 978-0-444-89037-5. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/49142942/0444890378-Fluid-Catalytic-Cracking>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

SCHMIDT, H. L.; WERNER, R. A.; ROSSMANN, A., ^{18}O pattern and biosynthesis of natural plant products. **Phytochemistry**, v. 58, p. 9-32. 2001.

SCHMIDT, T. C.; ZWANK, L.; ELSNER, M.; BERG, M.; MECKENSTOCK, R. U.; HADERLEIN, S. B. Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 283-300. 2004.

SCHULTZ, N. M.; GRIFFIS, T. J.; LEE, X.; BAKER, J. M. Identification and correction of spectral contamination in $2\text{H}/1\text{H}$ and $18\text{O}/16\text{O}$ measured in leaf, stem, and soil water. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**; v. 25, p. 3360-3368. 2011.

SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; DE NÓBREGA, J.C.M. (Orgs.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. 1.ed. Piracicaba: Livroceres, 2006. V. 1, 415 p.

SESSIONS, A. L. Review: Isotope-ratio detection for gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1946-1961. 2006.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 108-114. 2007.

SLATER, G. F., DEMPSTER, H. S.; SHERWOOD-LOLLAR, B.; AHAD, J. Headspace analysis: A new application for isotopic characterization of dissolved organic contaminants. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 190-194. 1999.

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

SMITH, D. M.; INMAN-BAMBER, N. G.; THORBURN, P. J., Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, v. 92, p. 169-183. 2005.

SRACEK, O.; HIRATA, R., Geochemical and stable isotopic evolution of the Guarani Aquifer System in the state of São Paulo, Brazil. **Hydrogeology Journal**, v. 10, p. 643-655. 2002.

THERMO SCIENTIFIC. Thermo Scientific irm-GC/MS. Material de divulgação BR30149_E 03/08C. Disponível em: <

http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Marketing%20Material/MassSpectrometryCollateral/Brochures/BR30149_GC_IsoLink.pdf>.

Acesso em: 15 ago. 2013.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, p. 441-446. 2004.

TOLOSA, I.; OGRINC, N. Utility of 5A molecular sieves to measure carbon isotope ratios in lipid biomarkers. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p. 172-181. 2007

TORRES, E. M. M. A evolução da indústria petroquímica brasileira. **Química Nova**, v. 20, 49-54. 1997.

TRIVELIN, P. C. O. ; VITTI, A. C. Manejo do nitrogênio e enxofre na nutrição e adubação de cana-de-açúcar. In: **Simpósio de Tecnologia de Produção de Cana-de-Açúcar**, 2005, Piracicaba. Anais. Piracicaba: GAPE, 2005. p. 1-46.

VAN KEER, I.; BRONDERS, J.; TOUCHANT, K.; VERHACK, J.; WILCZEK, D. Detection and measurement techniques to identify the presence of NAPLs in the field, pp. 59-69 in: Annable, M. D.; Teodorescu, M.; Hlavinek, P.; Diels, L.; (eds.). **Methods and Techniques for Cleaning-up Contaminated Sites**. Springer, Dordrecht (The Netherlands). 2008, VIII, 196 p.

VAN KLINK, A. J. E. M.; HARTKAMP, M. B.; O'CONNOR, P. The Origin and Formation of FCC Gasoline Aromatics. In. H.J. LOVINK AND L.A. PINE, **The Hydrocarbon Chemistry of FCC Naphtha Formation: Proceedings of the Symposium of the Division of Petroleum Chemistry, Inc.**, American Chemical Society, Flórida, 10-15/09/1989, pp. 133-146. Editions Technip, Paris, 1990. 238 p.

WARD, J. A. M.; AHAD, J. M. E.; LACRAMPE-COULOUME, G.; SLATER, G. F.; EDWARDS, E. A.; SHERWOOD LOLLAR, B. Hydrogen isotope fractionation during methanogenic degradation of toluene: Potential for direct verification of bioremediation. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 4577-4581. 2000.

XIAO, W.; LEE, X.; WEN, X.; SUN, X.; ZHANG, S. Modeling biophysical controls on canopy foliage water ¹⁸O enrichment in wheat and corn. **Global Change Biology**, v. 18, p. 1769-1780. 2012.

YAMADA, K.; UZAKI, M.; KON, M.; NARAOKA, H.; ISHIWATARI, R. Molecular Sieve Isolation Technique for Use in Stable Carbon Isotope Analysis of Individual Long-Chain n-Alkanes in Crude Oil. **Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan**, v. 42, p. 237-246. 1994.

ZHAO, X; ROBERIE, T. G.; RAJAGOPALAN, K. R. p-Xylene yield in fluid catalytic cracking products. **Applied Catalysis A: General**, v. 145, p. 407-418. 1996.

ZHANG, B. L.; YUNIANITA; MARTIN M. L. Site-specific isotope fractionation in the characterization of biochemical mechanisms. The glycolytic pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 16023-16029. 1995.

ZWANK, L., M. BERG, T. C. SCHMIDT AND S. B. HADERLEIN. Compound-specific carbon isotope analysis of volatile organic carbons in the low-microgram per liter range. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 5575-5583. 2003.

12

Anexos

12.1. Anexo 1 – Concentrações de BTEX nas amostras de gasolina A

Concentrações de BTEX nas amostras de gasolina pura das refinarias estudadas (mg g⁻¹)

Refinaria	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	m/p-Xilenos	o-Xileno
R01_1 - 13/03/12	11,2	56,7	20,0	60,4	20,5
R01_2 - 19/03/12	9,7	49,2	16,1	52,6	17,7
R01_3 - 21/03/12	9,6	50,4	16,2	53,3	18,1
R01_4 - 22/03/12	8,7	45,8	15,0	50,1	17,0
R01_5 -	9,2	49,0	16,0	54,1	18,2
R01_6	10,1	51,1	17,0	57,6	19,2
R01_7	8,4	31,9	7,5	35,3	11,3
R01_8	6,4	30,9	7,4	34,0	11,2
R01_9	16,1	83,9	26,1	98,4	31,2
R01_10	22,3	106,4	32,2	115,6	38,2
R01_11					
R01_12					
R06_1 - 08/01/12	10,5	49,6	14,7	54,6	17,6
R06_2 - 02/03/12	11,1	56,9	15,6	58,5	19,1
R06_3					
R07_1	8,9	42,9	7,8	36,6	11,3
R07_2	8,4	37,5	8,6	39,4	12,7
R07_3					
R04_1	6,0	36,0	10,0	45,3	14,7
R04_2	7,3	72,0	19,2	68,3	28,1
R04_3					
R02_1	5,1	34,3	6,6	27,1	9,1
R02_2					
R03_3					

**Concentrações de BTEX nas amostras de gasolina pura
das refinarias estudadas (mg g⁻¹) – continuação**

Refinaria	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	m/p-Xilenos	o-Xileno
R05_1	11,4	56,2	9,8	46,3	15,0
R05_2					
R05_3					
R08_1	7,1	49,2	13,6	54,8	21,0
R08_2					
R08_3					
R03_1	10,2	48,6	11,0	48,1	16,0
R03_2					
R03_3					
R09_1 - 08/07/12					
R09_2					
R09_3					
R11_1					
R11_2					
R10_1					
R11_2					

12.2. Anexo 2 – Concentrações de BTEX nas soluções aquosas de gasolina

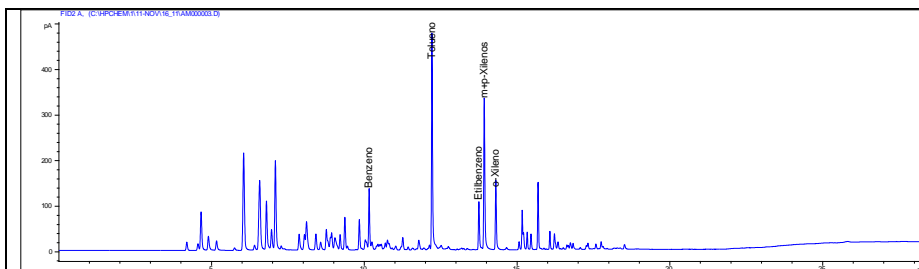
Concentrações de BTEX nas soluções aquosas de gasolina das refinarias estudadas de água ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Refinaria	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	m/p-Xilenos	o-Xileno
R01_1 - 13/03/12	63	229	54	171	69
R01_2 - 19/03/12	76	325	97	313	119
R01_3 - 21/03/12	64	301	83	282	109
R01_4 - 22/03/12	67	305	86	300	115
R01_5 -	71	318	89	303	118
R01_6	70	318	89	299	115
R01_7	72	276	72	234	94
R01_8	110	459	131	437	169
R01_9	81	329	102	333	128
R01_10	47	209	61	203	78
R01_11					
R01_12					
R06_1 - 08/01/12	66	297	56	233	89
R06_2 - 02/03/12	59	225	58	235	91
R06_3					
R07_1	71	220	58	238	92
R07_2	54	402	107	379	172
R07_3					
R04_1	74	338	80	335	130
R04_2	46	178	46	175	69
R04_3					
R02_1	79	505	99	363	147
R02_2	106	561	109	490	179
R02_3	103	557	107	471	173

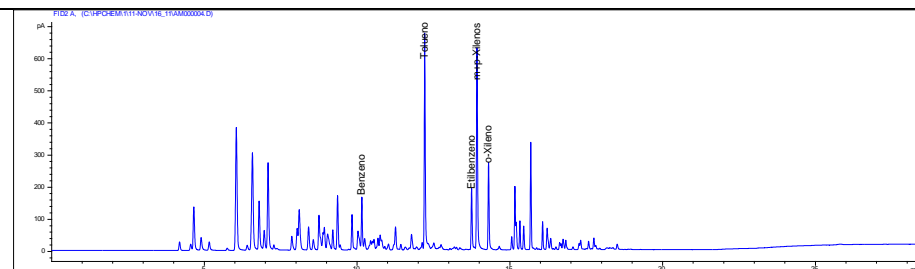
**Concentrações de BTEX nas soluções aquosas de gasolina
das refinarias estudadas de água ($\mu\text{g L}^{-1}$) – continuação**

Refinaria	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	m/p-Xilenos	o-Xileno
R05_1	85	405	63	271	101
R05_2	54	198	56	208	79
R05_3					
R08_1	96	577	194	742	296
R08_2	98	332	88	335	134
R08_3					
R03_1	116	430	112	431	160
R03_2	95	402	93	385	147
R03_3	103	400	97	400	152
R09_1 - 08/07/12	91	281	73	297	111
R09_2	77	289	75	316	118
R09_3					
R11_1					
R11_2					
R10_1					
R11_2					

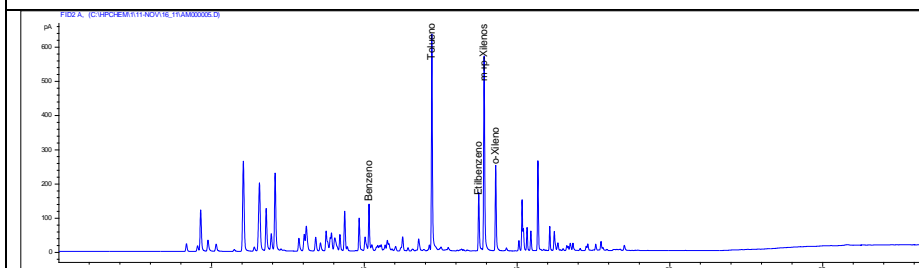
12.3. Anexo 3 – Perfis cromatográficos das soluções aquosas de gasolina das refinarias estudadas



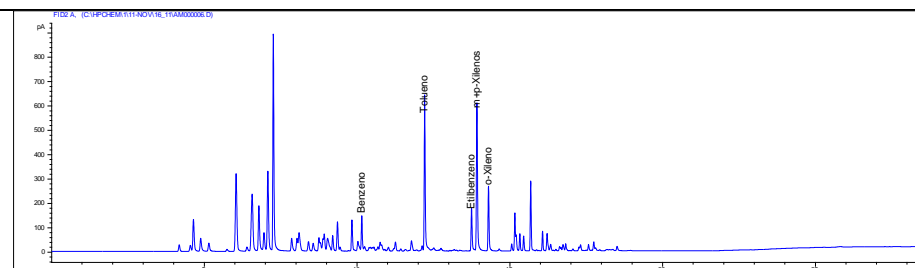
R01_1



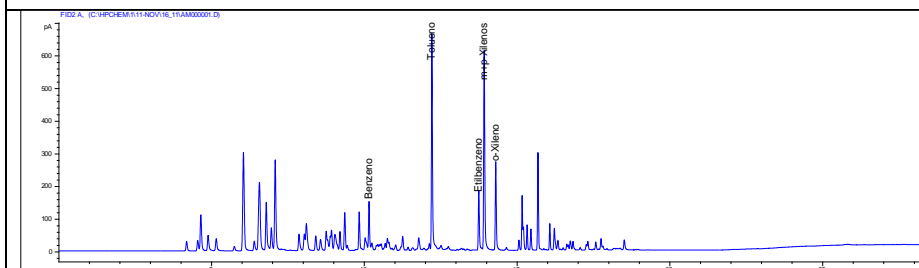
R01_2



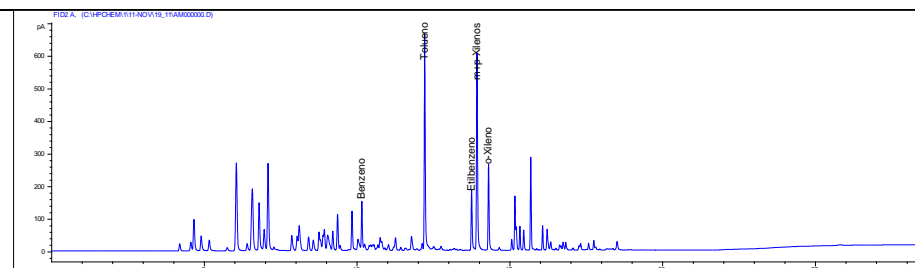
R01_3



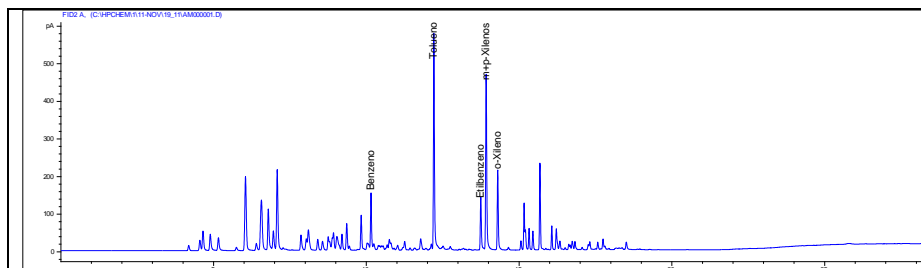
R01_4



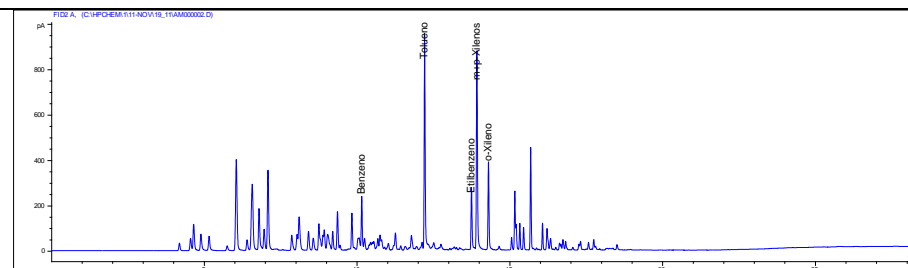
R01_5



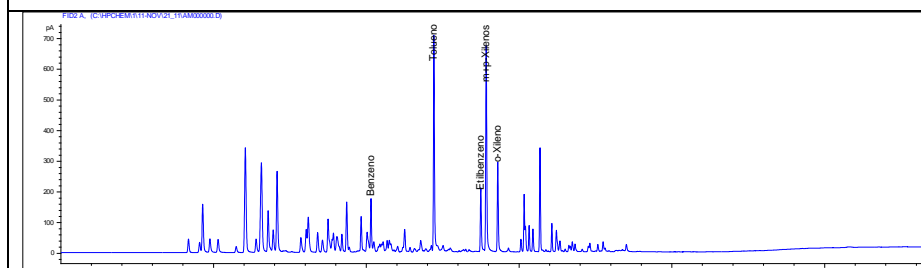
R01_6



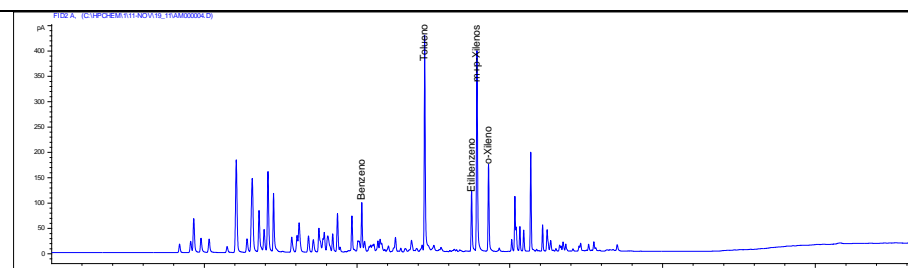
R01_7



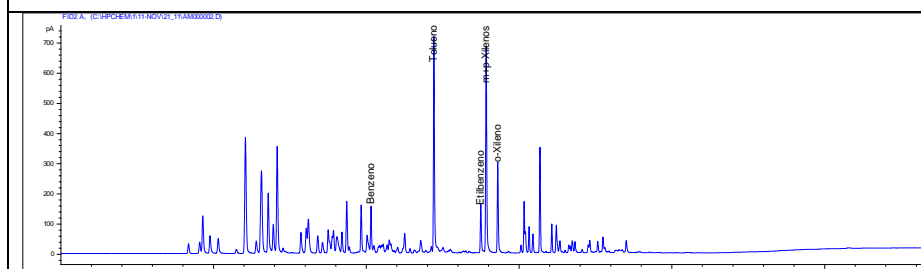
R01_8



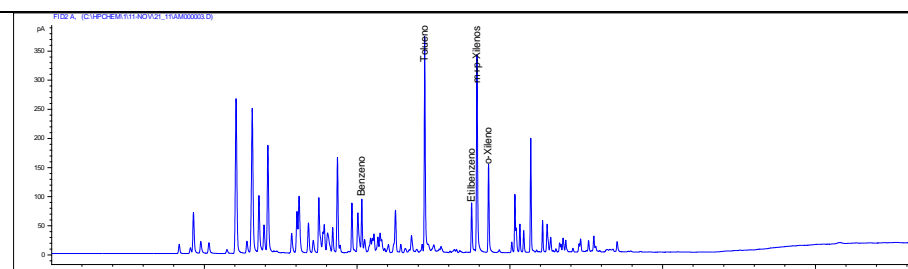
R01_9



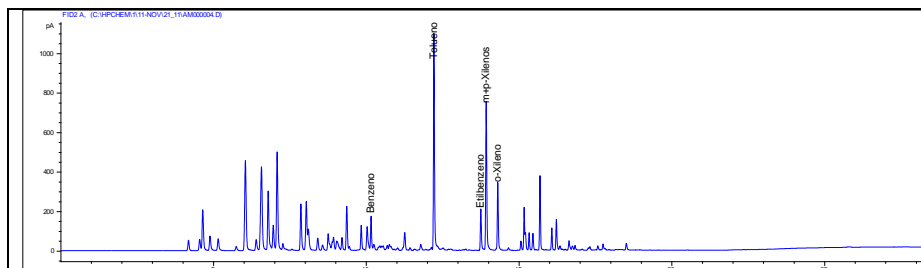
R01_10



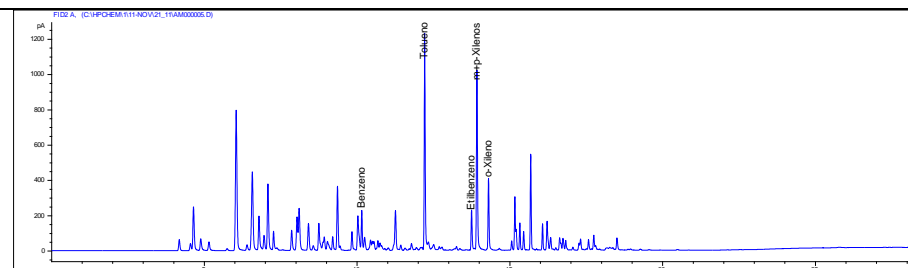
R04_1



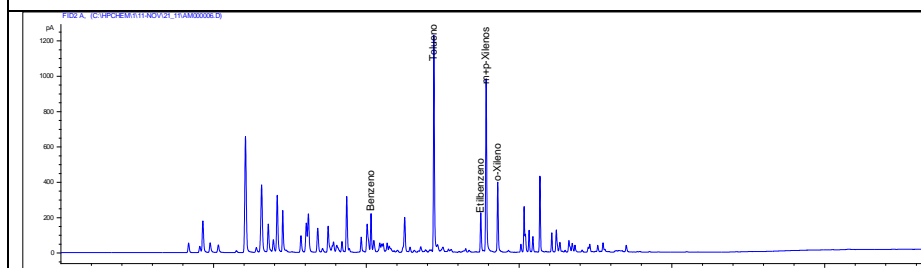
R04_2



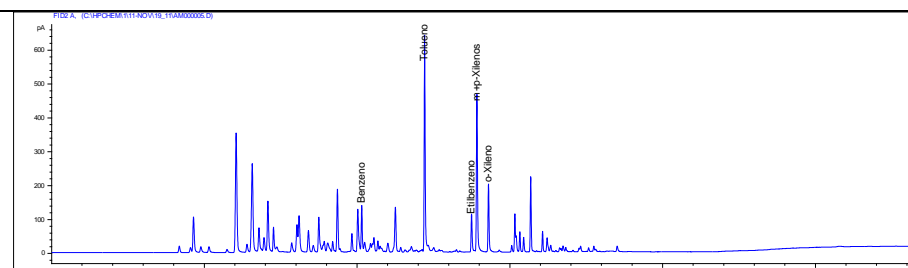
R02_1



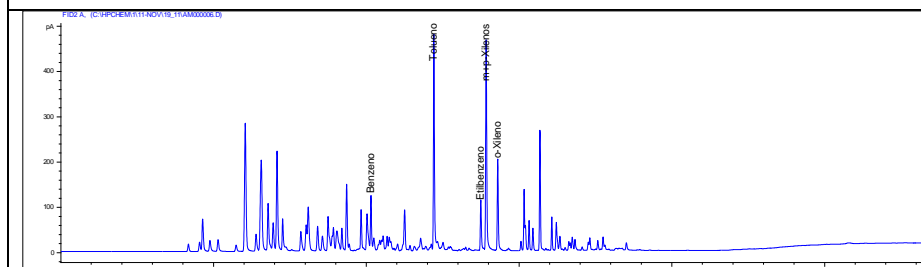
R02_2



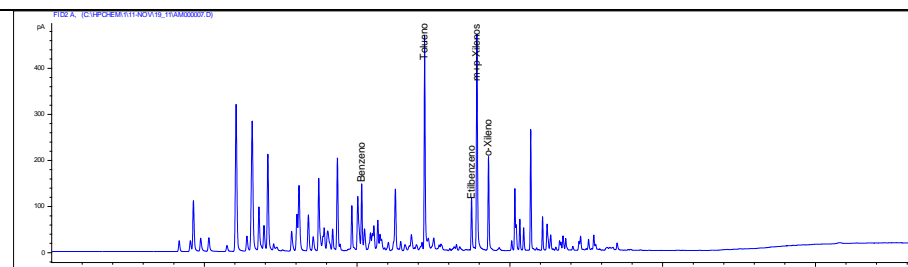
R02_3



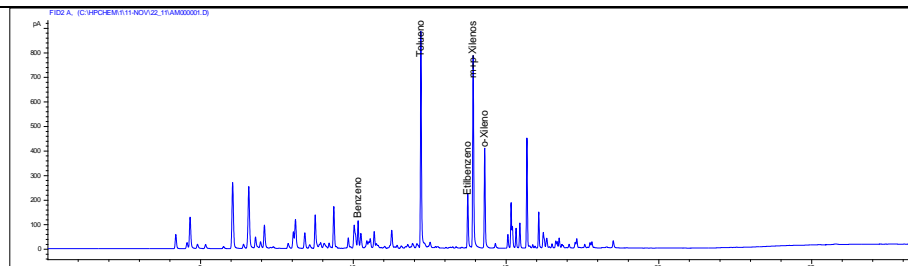
R06_1



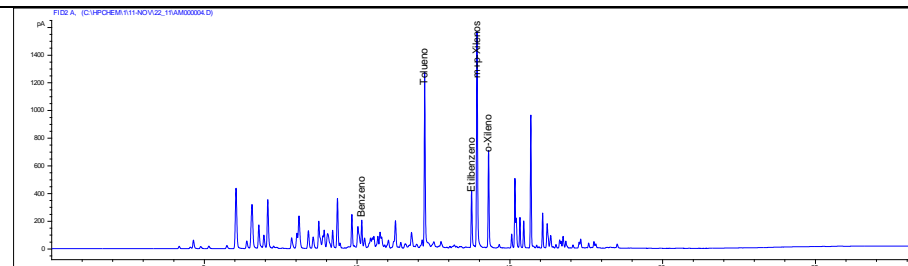
R06_2



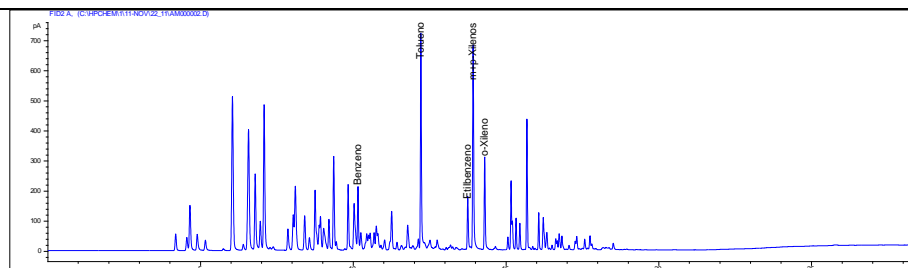
R07_1



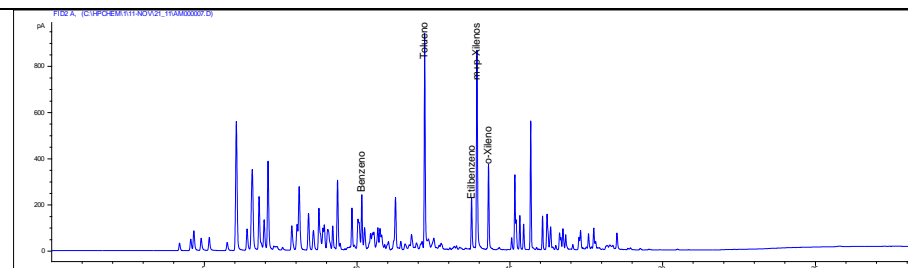
R07_2



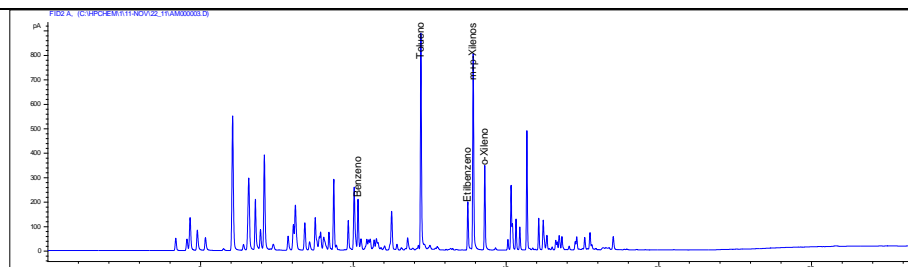
R08_1



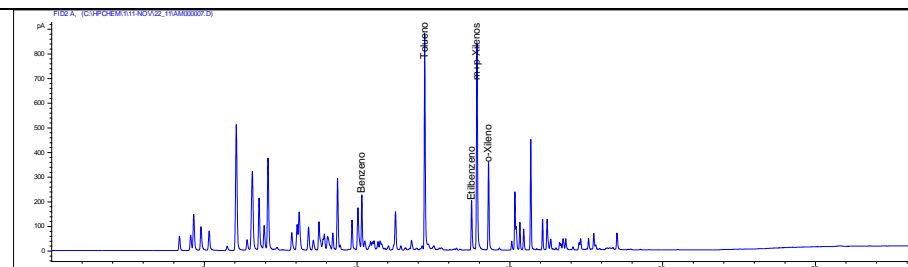
R08_2



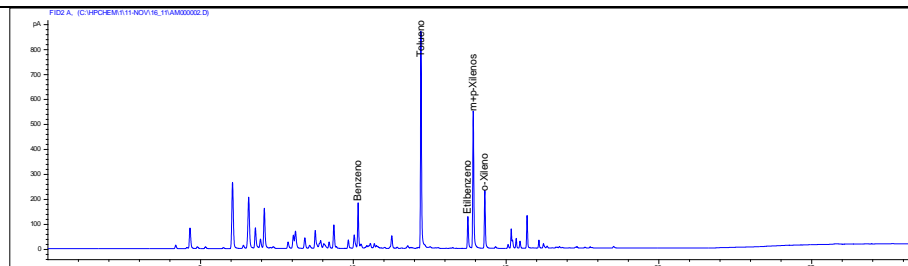
R03_1



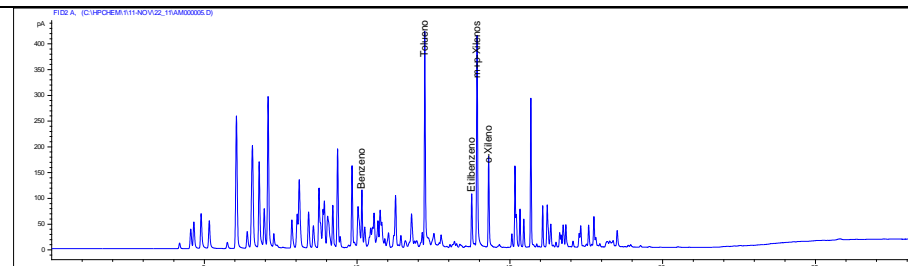
R03_2



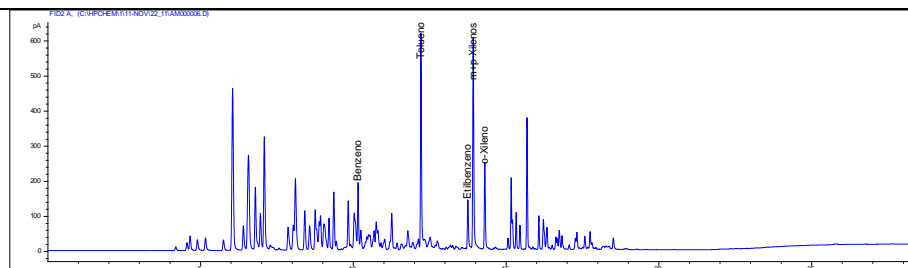
R03_3



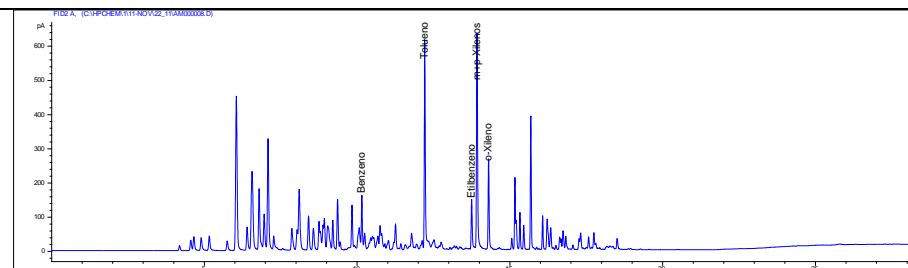
R05_1



R05_2



R09_1



R09_2

12.4. Anexo 4 – Avaliação estatística (ANOVA) dos resultados

Tabela A4.1 - Grupos Homogêneos da ANOVA dos resultados de $\delta^2\text{H}$ do Tolueno presente na gasolina das refinarias estudadas

No.	AMOSTRA-GEM	MÉDIA TOLUENO	1	2	3	4	5	6	7	8
12	R12	-97,2787					****			
6	R06	-85,6800						****		
5	R05	-77,9370				****				
10	R10	-76,4098	****			****				
1	R01	-76,1165	****							
4	R04	-75,9456	****	****		****				
9	R09	-75,6105	****	****	****					
8	R08	-74,9312	****	****	****					
11	R11	-73,6105		****	****					
3	R03	-73,5736			****					
2	R02	-67,2733							****	
7	R07	-63,5887								****

LSD test; Homogenous Groups, alpha = ,05000

Error: Between MS = 3,3494, df = 80,000

Exclude cases (25): 14:15; 43:46; 52:54; 60; 61:63; 79:84; 104; 109:110;

112:114

Tabela A4.2 - Grupos Homogêneos da ANOVA dos resultados de $\delta^2\text{H}$ do Etilbenzeno presente na gasolina das refinarias estudadas

No.	AMOSTRA-GEM	MÉDIA ETILBENZENO	1	2	3	4	5	6	7	8
5	R05	-87,0672					****			
12	R12	-86,9387					****			
6	R06	-80,1405		****						
3	R03	-77,0749		****	****					
2	R02	-76,6423	****	****	****					
10	R10	-75,5618	****		****					
4	R04	-72,4208	****			****				
9	R09	-72,4075	****			****				
8	R08	-69,5320				****		****		
11	R11	-66,2476						****	****	
1	R01	-63,4716							****	
7	R07	-51,9657								****

LSD test; Homogenous Groups, alpha = ,05000

Error: Between MS = 17,991, df = 88,000

Exclude cases (17): 4; 7:9; 11; 64:66; 80; 82:84; 104;110; 113:114; 116

Tabela A4.3 - Grupos Homogêneos da ANOVA dos resultados de $\delta^2\text{H}$ do m,p-Xileno presente na gasolina das refinarias estudadas

No.	AMOSTRA-GEM	MÉDIA m,p-XILENO	1	2	3	4	5	6	7
12	R12	-97,4077					****		
5	R05	-86,3411		****					
7	R07	-85,3520		****					
6	R06	-84,7089		****					
10	R10	-81,5485			****				
9	R09	-80,2520	****		****				
2	R02	-79,8864	****		****				
4	R04	-78,6597	****			****			
8	R08	-78,6282	****			****			
1	R01	-76,8624				****			
11	R11	-74,6853						****	
3	R03	-67,8210							****

LSD test; Homogenous Groups, alpha = ,05000

Error: Between MS = 5,1790, df = 83,000

Exclude cases (22): 10:12; 37; 43:46; 52:54; 64:65; 73:75; 85:87; 112:114

Tabela A4.4 - Grupos Homogêneos da ANOVA dos resultados de $\delta^2\text{H}$ do o-Xileno presente na gasolina das refinarias estudadas

No.	AMOSTRA-GEM	MÉDIA o-XILENO	1	2	3	4	5	6	7
12	R12	-80,8700					****		
6	R06	-77,7356					****		
3	R03	-71,2061	****						
5	R05	-71,0588	****						
10	R10	-69,4378	****	****					
8	R08	-67,4250		****					
9	R09	-66,8645		****				****	
4	R04	-64,2822			****			****	
2	R02	-63,3912			****	****			
11	R11	-62,0525			****	****			
1	R01	-61,1272				****			
7	R07	-51,5590							****

LSD test; Homogenous Groups, alpha = ,05000

Error: Between MS = 7,1514, df = 73,000

Exclude cases (32): 4:5; 7:8; 10:11; 18:21; 37:40; 64:65; 67:68; 70:72;
79:80; 82:84; 86:103; 112:114; 116