

Aplicações da Análise de Isótopos Estáveis na Agricultura



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Solos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 198

Aplicações da Análise de Isótopos Estáveis na Agricultura

*Caio de Teves Inácio
Segundo Urquiaga*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Solos

Endereço: Rua Jardim Botânico, 1024. Jardim Botânico

CEP: 22460-000 - Rio de Janeiro, RJ

Fone: + 55 (21) 2179-4500

Fax: + 55 (21) 2179-5291

<https://www.embrapa.br>

<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José Carlos Polidoro*.

Secretário-Executivo: *Jacqueline S. Rezende Mattos*.

Membros: *Ademar Barros da Silva, Adriana Vieira de C. de Moraes, Alba Leonor da Silva Martins, Enyomara Lourenço Silva, Evaldo de Paiva Lima, Joyce Maria Guimarães Monteiro, Luciana Sampaio de Araujo, Maria Regina Laforet, Maurício Rizzato Coelho, Moema de Almeida Batista, Wenceslau Geraldes Teixeira*

Supervisão editorial: *Jacqueline S. Rezende Mattos*

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização bibliográfica: *Enyomara Lourenço Silva*

Editoração eletrônica: *Moema de Almeida Batista*

Foto da capa: *Caio de Teves Inácio*

1ª edição

On-line (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Solos

Inácio, Caio de Teves.

Aplicações da análise de isótopos estáveis na agricultura / Caio de Teves Inácio, Segundo Urquiaga. – Dados eletrônicos. – Rio de Janeiro : Embrapa Solos, 2017.

52 p. : il. – (Documentos / Embrapa Solos, ISSN 1517-2627 ; 198).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<https://www.embrapa.br/solos/publicacoes>>.

Título da página da Web (acesso em 29 dez. 2017).

1. Química do solo. 2. Isótopo. 3. Fertilizante. 4. Nutrição vegetal. I. Urquiaga, Segundo. II. Embrapa Solos. III. Título. IV. Série.

CDD 631.41

© Embrapa 2017

Autores

Caio de Teves Inácio

Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Solos, Rio de Janeiro, RJ

Segundo Urquiaga

Engenheiro-agrônomo, doutor em Solos e Nutrição de Plantas, pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ

Apresentação

Esta Série Documentos traz uma ampla visão sobre as possibilidades de aplicação da análise de isótopos estáveis na ciência agrícola. Esta obra vai além de abordar a clássica aplicação da técnica de enriquecimento com ^{15}N para estudos com fertilizantes. Aprofunda-se também nas aplicações do uso da abundância natural de outros isótopos estáveis relevantes, como ^2H , ^{13}C , ^{18}O , e o ^{34}S , de grande aplicação nas ciências naturais, que vai de estudos básicos como a biodegradação de resíduos orgânicos e da matéria orgânica do solo até estudos mais aplicados como a autenticação de *alimentos orgânicos*. Avanços recentes e inovadores sobre o uso da abundância natural de ^{15}N para estudos com fertilizantes orgânicos abrem novas possibilidades para a pesquisa agrícola e aplicação prática.

Daniel Vidal Pérez

Chefe-geral da Embrapa Solos

Sumário

Conceitos Básicos e Nomenclatura	9
Isótopos Estáveis	9
Valores Absolutos (x) e Relativos (δ).....	10
Fracionamento Isotópico	14
Aplicações na Agricultura	15
^{13}C	15
^{34}S	24
^2H e ^{18}O	28
^{15}N	29
Conclusões	41
Referências	42

Aplicações da Análise de Isótopos Estáveis na Agricultura

*Caio de Teves Inácio
Segundo Urquiaga*

Conceitos Básicos e Nomenclatura

Isótopos Estáveis

Isótopos estáveis de hidrogênio (H), carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O) e enxofre (S) ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. Isótopos são átomos de um elemento com o mesmo número de prótons (mesmo número atômico), mas diferente número de nêutrons (massa atômica diferente) no núcleo. Isótopos estáveis não estão sujeitos ao decaimento radioativo, em oposição aos isótopos radioativos (emissão β , α). Portanto, existe uma variação na composição isotópica no ambiente que é devida aos processos físicos e químicos de fracionamento isotópico e não ao decaimento radioativo. Cada elemento possui um isótopo “leve” dominante com o peso atômico nominal (^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S), e um ou mais isótopos “pesados” (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S) (Tabela 1). Além desses cinco elementos com grande aplicação na Ecologia e na Agronomia, a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) lista um total de 20 elementos com variações na abundância natural de seus isótopos estáveis (Li, B, Mg, Si, Cl, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, Se, Mo, Pd, Te, e Ti) (Tabela 1).

Tabela 1. Abundância natural de isótopos estáveis importantes para as ciências biológicas.

Elemento	Número atômico	Isótopo estável	Abundância (fração molar)
Hidrogênio	1	¹ H	0,999 844 26
		² H	0,000 155 74
Carbono	6	¹² C	0,988 922
		¹³ C	0,011 078
Nitrogênio	7	¹⁴ N	0,996 337
		¹⁵ N	0,003 663
Oxigênio	8	¹⁶ O	0,997 620 6
		¹⁷ O	0,000 379 0
		¹⁸ O	0,002 000 4
Enxofre	16	³² S	0,950 407 4
		³³ S	0,007 486 9
		³⁴ S	0,041 959 9
		³⁶ S	0,000 145 79

Fonte: Coplen et al. (2002).

Embora os isótopos de um mesmo elemento participem das mesmas reações químicas, isso ocorre em taxas diferentes gerando uma variação na abundância natural desses elementos. Reações químicas e processos físicos, tais como evaporação e condensação, discriminam contra isótopos “pesados”. O fracionamento resulta em produtos isotopicamente mais “leves” (contêm menos do isótopo “pesado”) que o material precursor. Essas variações na abundância natural, tal como ocorre devido ao fracionamento pelas reações de fotossíntese (¹²C/¹³C), fixação biológica de N (¹⁴N/¹⁵N), evaporação (¹H/²H; ¹⁶O/¹⁸O) e oxidação biológica (³²S/³⁴S), permitem uma gama de aplicações nas mais diversas ciências naturais (COPLEN et al., 2002), entre elas a Agronomia e a Ciência do Solo. A abordagem alternativa ao uso das variações na abundância natural é o uso de materiais artificialmente enriquecidos isotopicamente (p. ex.: >1% de ¹⁵N), os chamados traçadores, que são adicionados ao sistema em estudo.

Valores absolutos (x) e relativos (δ)

A rigor, não há um valor absoluto de abundância isotópica *per se* porque cada medida contém uma incerteza expressa como desvio

padrão ou outro parâmetro estatístico similar (COPLEN, 2011). Tomando os isótopos de N como exemplo, podemos expressar os valores absolutos (x) conforme a Equação 1:

$$\text{Fração atômica de } ^{15}\text{N}, x(^{15}\text{N}) = \frac{\text{quantidade de } ^{15}\text{N}}{\text{quantidade de } ^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}} \quad (1)$$

Ou como excesso da fração atômica de ^{15}N (Equação 2).

$$x^E(^{15}\text{N})_{\text{amostra/referência}} = x(^{15}\text{N})_{\text{amostra}} - x(^{15}\text{N})_{\text{referência}} \quad (2)$$

Onde a fração atômica de ^{15}N da referência internacional do N_2 do ar, $x(^{15}\text{N})_{\text{ar}}$, foi determinada precisamente como $0,003\,663 \pm 0,000\,004$ (JUNK; SVEC, 1958). O excesso da fração atômica, $x^E(^{15}\text{N})$, é muito empregado para amostras enriquecidas, p. ex.: fertilizantes como ureia e sulfato de amônia. As primeiras aplicações de ^{15}N como um traçador envolveram as tentativas para estimar a eficiência dos fertilizantes nitrogenados, aplicando ao solo materiais enriquecidos ou empobrecidos em ^{15}N (HAUCK; BREMNER, 1976). Quando as amostras têm a composição isotópica próxima à abundância natural, o uso do valor relativo (δ) é preferido ao invés do valor absoluto (x) (COPLEN, 2011). O valor δ é a razão isotópica de uma amostra relativa à razão isotópica do padrão internacional (Equação 3). Como o N tem apenas dois isótopos (^{14}N e ^{15}N), então:

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{amostra}}}{R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{padrão}}} - 1 \quad (3)$$

Onde o padrão internacional por definição tem (δ) = 0. Comumente valores de (δ) são expressos *per mil* ou ‰, apesar de não ser uma prática do Sistema Internacional (S.I.) de Unidades.

Chalk et al. (2015c) chamam a atenção para um erro comum na literatura quando se substitui o R por $x(^{15}\text{N})$ na Equação 3. Apesar de essa substituição resultar em valores similares de (δ) para ^{15}N , para outros isótopos com maior fração atômica, como os isótopos ^{13}C e ^{34}S , os resultados são mais discrepantes.

O valor R é calculado como:

$$\text{Razão Isotópica, } R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) = \frac{x(^{15}\text{N})}{1 - x(^{15}\text{N})} \quad (4)$$

Portanto, para o padrão internacional (ar), onde a fração atômica de $^{15}\text{N} = 0,003\ 663$.

$$\begin{aligned} \text{Então, } R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) &= 0,003\ 663 \div (1 - 0,003\ 663) \\ &= 0,003\ 663 \div 0,996\ 337 = 0,003\ 676\ 47 \end{aligned}$$

Um cuidado deve ser tomado, porque muitas vezes, na literatura, o valor $R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) = 0,003\ 663$ é usado no lugar do valor correto 0,003 676 47 (CHALK et al., 2015c). Então, para uma amostra cuja fração atômica de ^{15}N , $x(^{15}\text{N})$ é igual a 0,003 686, temos:

$$\begin{aligned} R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) &= 0,003\ 686 \div (1 - 0,003\ 686) \\ &= 0,003\ 686 \div 0,996314 = 0,003\ 699\ 64 \end{aligned}$$

Desta forma, substituindo os valores acima na Equação 3, temos:

$$\delta^{15}\text{N} = (0,003\ 699\ 64 \div 0,003\ 676\ 47) - 1 = +6,3 \times 10^{-3} = +6,3\text{‰}$$

Exemplos adicionais são apresentados na Tabela 2.

Portanto, um valor de $\delta(i^E)$ (p. ex.: $\delta^{15}\text{N}$) positivo indica que a amostra é mais enriquecida no isótopo “pesado” (^{15}N contra ^{14}N) que a referência, e valores negativos de $\delta(i^E)$ indicam que a amostra é empobrecida no isótopo “pesado” em relação à referência (COPLIN et al., 2002).

Tabela 2. Valores relativos (δ) da abundância de ^{15}N considerando a faixa de valores de $\delta^{15}\text{N}$ normalmente encontrada para solos, plantas e fertilizantes.

Amostra	$x(^{15}\text{N})$ %	$x(^{15}\text{N})$	$x^E(^{15}\text{N})$ %	$R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})$ ⁽¹⁾	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$ ⁽²⁾ Equação 3
1	0,3637	0,003637	-0,0026	0,00365028	-7,12
2	0,3643	0,003643	-0,002	0,00365632	-5,48
3	0,3653	0,003653	-0,001	0,00366639	-2,74
Ar	0,3663	0,003663	0,0	0,00367647	0,0
4	0,3667	0,003667	+0,0004	0,00368050	+1,096
5	0,3673	0,003673	+0,001	0,00368654	+2,74
6	0,3683	0,003683	+0,002	0,00369661	+5,48
7	0,3693	0,003693	+0,003	0,00370669	+8,22
8	0,3703	0,003703	+0,004	0,00371676	+10,96
9	0,3713	0,003713	+0,005	0,00372684	+13,70
10	0,3718	0,003718	+0,0055	0,00373188	+15,07

⁽¹⁾ $x(^{15}\text{N})/(100 - x(^{15}\text{N}))$.

⁽²⁾ O segundo e o terceiro decimais não denotam o nível de precisão da medição, apenas são mostrados para efeito de comparação.

Fonte: Modificado de Chalk et al. (2015c).

A relação entre $\delta^{15}\text{N}$ e o excesso da fração atômica de ^{15}N , $x^E(^{15}\text{N})_{\text{amostra/ar}}$, na faixa de 7‰ a 15‰ (Figura 1), pode ser expressada simplificada como a Equação 5:

$$\delta^{15}\text{N} = 2740 \times x^E(^{15}\text{N})_{\text{amostra/ar}}, \text{ em } \text{‰} \quad (5)$$

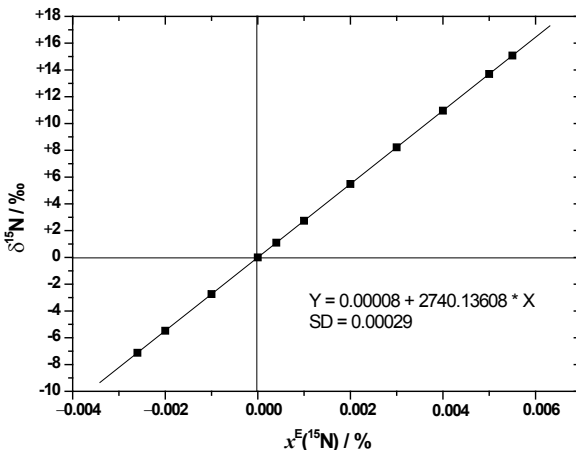


Figura 1. Relação entre $\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$ e o excesso da fração atômica, $x^E(^{15}\text{N})/\text{‰}$, na faixa de valores de δ apresentados por Inácio et al. (2015a) para solos, plantas e fertilizantes (CHALK et al., 2015c).

Onde o incremento de $1 \delta/\text{‰}$ é equivalente ao incremento de $0,003649 \times 10^{-3}$ de excesso da fração atômica de ^{15}N , $x(^{15}\text{N})$ (Figura 1).

Esse valor é menor do que $0,003663 \times 10^{-3}$ proposto por Doughton et al. (1992). Essa diferença é atribuída à aproximação comum, porém errônea, de que o valor de 1δ está diretamente relacionado à fração atômica, $x(^{15}\text{N})$, quando de fato este é relacionado à razão isotópica, $R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})$, na Equação 3 (CHALK et al., 2015c).

Fracionamento Isotópico

O fracionamento isotópico pode ocorrer como resultado de um processo físico (p. ex.: difusão), químico (p. ex.: troca iônica) ou biológico (enzimático). O fracionamento isotópico pode ser expresso de duas formas:

Fator de fracionamento (α), $\alpha = \delta A / \delta B$

Onde A é o reagente e B é o produto da reação (em equilíbrio).

Ou como discriminação (Δ ou ε) em unidade por mil (‰) (Equação 6).

$$\varepsilon / \text{‰} = (\delta s - \delta p) \times [1 + (\delta p \times 1.000)] \quad (6)$$

Onde δs é o substrato e δp é o produto.

Uma aproximação da equação acima é (Equação 7):

$$\varepsilon \text{‰} = \delta s - \delta p \quad (7)$$

O fator de fracionamento (α) é aproximado por:

$$\varepsilon = (\varepsilon / 1.000) + 1$$

ou

$$\varepsilon = (\alpha - 1) \times 1.000$$

Então, para fator de fracionamento (α) de 1,020, o ϵ do produto = -20‰ relativo ao substrato (HÖGBERG, 1997).

Processos físicos de fracionamento isotópico incluem aqueles cujas taxas de difusão são dependentes da massa, tais como ultrafiltração ou difusão gasosa de íons ou moléculas. Processos químicos de fracionamento isotópico envolvem a redistribuição dos isótopos de um elemento em suas fases, moléculas ou espécie química. Estes podem ser: (1) fracionamentos isotópicos em equilíbrio, quando as taxas de reações bidirecionais são iguais para reações de troca iônica, ou (2) fracionamentos isotópicos cinéticos, causados por reações unidirecionais cuja reação de formação do produto é dependente da massa do elemento. Nas reações isotópicas em equilíbrio, o isótopo “pesado” estará enriquecido na substância com o estado de oxidação mais elevado, e também no estado mais condensado, em geral. Em processos cinéticos, o isótopo “leve” forma ligações mais fracas e mais facilmente quebradas. Portanto, o isótopo “leve” é mais reativo e, dessa forma, se concentra mais no produto, deixando o reagente (remanescente) enriquecido em isótopo “pesado”. A maioria das reações biológicas são exemplos de fracionamento cinético (p. ex.: fotossíntese e redução de sulfatos por bactérias) (COPLEN et al., 2002).

O equilíbrio isotópico entre duas fases não significa que ambas tenham frações molares (abundância) idênticas de cada isótopo. Nesse caso, somente as frações molares são constantes. Por exemplo, o vapor d'água em um sistema fechado em contato com água líquida, em uma temperatura constante, tem as concentrações dos isótopos “pesados”, ^2H e ^{18}O , mais elevadas na fase líquida do que no vapor (COPLEN et al., 2002).

Aplicações na Agricultura

^{13}C

A Assinatura Isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) das Plantas

A composição isotópica ou assinatura isotópica do tecido vegetal ($\delta^{13}\text{C}$) é função, principalmente, do fracionamento isotópico do CO_2 durante a fotossíntese (DAWSON et al., 2002). A difusão do CO_2

através do estômato foliar (um processo físico) e a redução enzimática de CO_2 pela enzima RuBisCo durante a carboxilação (um processo bioquímico) contribuem para o fracionamento (discriminação) do isótopo ^{13}C , já que ambos os processos favorecem o isótopo ^{12}C , mais leve. Existem três tipos de metabolismo fotossintético vegetal: C3 (Ciclo Calvin); C4 (Rota Hatch-Slack); e CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas). Os primeiros produtos nos metabolismos C3 e C4 são moléculas de três e quatro átomos de carbonos, respectivamente. Plantas com metabolismo CAM possuem a rota C4 ativa durante a noite (ausência de luz) e ciclo C3 durante o dia (LARCHER, 2003). A maioria das plantas de clima temperado são espécies C3 (hortaliças em geral, cereais e frutíferas), enquanto muitas gramíneas tropicais possuem metabolismo C4 (milho, cana-de-açúcar, pastagens). O abacaxi é um exemplo de espécie CAM, da família das Bromélias, como os cactos (*Opuntia* spp.) encontrados em climas áridos. Conforme o metabolismo fotossintético, as plantas apresentam específicos valores de $\delta^{13}\text{C}$. Plantas C3 apresentam valores de δ entre -22‰ a -30‰, plantas C4 entre -10‰ a -14‰ e plantas CAM -10‰ a -35‰ (CERLING et al., 1997; COPLEN et al., 2002; LARCHER, 2003). A composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) do CO_2 da atmosfera é aproximadamente -8‰ (YUN; RO, 2008) mas esse valor de δ tem gradualmente se tornado mais negativo com o aumento das concentrações de CO_2 atmosférico (PECK; TUBMAN, 2010).

A rota fotossintética é o principal determinante da assinatura de $\delta^{13}\text{C}$ das plantas. No entanto, condições ambientais podem afetar os valores de δ , tais como estresse hídrico (seca), intensidade da radiação solar, altas/baixas temperaturas, baixa pressão atmosférica e estresse por ozônio (YUN; RO, 2008). Estresses ambientais, como o aumento da temperatura global, afetam o balanço de fracionamento entre a condutância estomática (taxa de passagem de CO_2) e a carboxilação (HULTINE et al., 2013). O suprimento de N pode afetar diretamente o $\delta^{13}\text{C}$ das plantas pelo aumento da taxa fotossintética e indiretamente pelos efeitos na eficiência no uso da água (HÖGBERG et al., 1997). O genótipo é também uma importante fonte de variação para valores de $\delta^{13}\text{C}$ das plantas (SERRET et al., 2008), e a composição isotópica do

CO₂ atmosférico local tem forte influência nesses valores de δ (p. ex.: cultivo em casas de vegetação aquecidas com queima de gás natural) (ROGERS, 2008; SCHMIDT et al., 2005).

A distribuição de ¹³C dentro das plantas não é uniforme, e diferenças fundamentais existem entre espécies C3 e C4 nesse aspecto (HOBBIE; WERNER, 2004). As raízes de plantas C3 são invariavelmente enriquecidas em ¹³C de 1‰ a 4‰ em comparação com as folhas (Figura 2), enquanto em plantas C4 essas diferenças são atenuadas. Grãos de trigo (C3) têm valores mais altos de $\delta^{13}\text{C}$ que as folhas ou a palha (SENBAYRAM et al., 2008; SERRET et al., 2008). Essas diferenças são relacionadas à distribuição desuniforme de ¹³C entre os constituintes bioquímicos da planta. Por exemplo, a lignina é empobrecida em ¹³C em comparação com a celulose ou hemicelulose, ou o tecido vegetal inteiro (BENNER et al., 1987).

O enriquecimento de $\delta^{13}\text{C}$ da celulose em comparação com a lignina varia de 2,5‰ a 4,6‰ em vários órgãos em plantas C3 e de 4,6‰ a 6,2‰ em plantas C4 (HOBBIE; WERNER, 2004). Sendo assim, tecidos vegetais ricos em lignina (p. ex.: palha de cereais) terão valores mais baixos de $\delta^{13}\text{C}$ que os grãos, os quais são pobres em lignina. Constituintes lipídicos também são empobrecidos em ¹³C em relação ao tecido vegetal inteiro devido ao fracionamento isotópico durante a oxidação da piruvato acetil CoA (enzima) na síntese lipídica (DENIRO; EPSTEIN, 1977). Uma ordem geral de valores de $\delta^{13}\text{C}$ parece ser alcanos < lipídios < tecido vegetal inteiro, sendo os alcanos e lipídios empobrecidos 6‰ em plantas C3 e 8‰ a 10‰ em plantas C4 em comparação com o tecido vegetal inteiro (COLLISTER et al., 1994). Além disso, a distribuição de ¹³C na cadeia de carbono de uma dada molécula orgânica pode não ser uniforme. A glicose derivada do amido de milho (C4) e da sacarose de beterraba açucareira (C3) apresenta o carbono 4 (posição na cadeia) relativamente mais enriquecido cerca de 5‰ a 6‰ e o carbono 6 empobrecido cerca de 5‰, os resultados foram consistentes para ambas as fontes (ROSSMANN et al., 1991).

A heterogeneidade na distribuição de ^{13}C na cadeia de carbono tem sido demonstrada para diversos constituintes bioquímicos nas plantas, p. ex.: frutose, etanol, entre outros (GILBERT et al., 2011a, GILBERT et al., 2011b; GILBERT et al., 2012). A distribuição desuniforme de ^{13}C entre constituintes bioquímicos dos tecidos vegetais bem como a distribuição heterogênea de ^{13}C dentro das moléculas orgânicas (Figura 2) são ambos explicados pelo efeito enzimático sobre o fracionamento, o qual irá ter também um papel no fracionamento isotópico de ^{13}C durante a biodegradação de resíduos agrícolas (CHALK et al., 2015a).

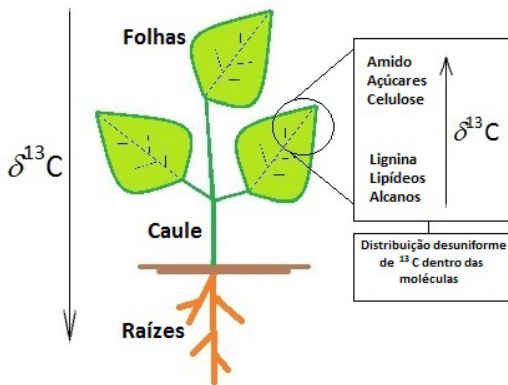


Figura 2. Diagrama esquemático mostrando o fracionamento pós-fotossintético de ^{13}C implicando diferenças em valores de δ em órgão e metabólitos em plantas. Setas sólidas (\uparrow , \downarrow) indicam o aumento no enriquecimento de ^{13}C (CHALK et al., 2015a).

Decomposição de Resíduos Agrícolas

As condições nas quais ocorre a biodegradação de resíduos agrícolas podem variar largamente em termos de temperatura, umidade e disponibilidade de oxigênio. Ou seja, pode variar do armazenamento anaeróbico de esterco animal até a compostagem aeróbia e termofílica de resíduos vegetais e animais. A abundância relativa de ^{13}C (δ) tem se tornado uma ferramenta indispensável para estudos de decomposição de substratos orgânicos em ecossistemas naturais e agrícolas (CHALK et al., 2015a). Em particular, o isótopo estável ^{13}C tem sido empregado para traçar e quantificar fluxos de C com o intuito de reconstruir a dinâmica da vegetação passada e mudanças no uso da terra, para determinar a respiração microbiana e para estudar a origem e a ciclagem da matéria orgânica do solo (FERNANDEZ et al., 2003).

No entanto, o potencial fracionamento de ^{13}C durante o processo de biodecomposição constitui um complicador fundamental na interpretação desses dados (CHALK et al., 2015a).

Fungos saprófitos e ectomicorrízicos apresentam a assinatura de $\delta^{13}\text{C}$ da biomassa enriquecida em comparação com o substrato. A média para o fator de fracionamento fungo/substrato foi determinada em: $\varepsilon = +1,4 \pm 0,8\text{‰}$ (fungos ectomicorrízicos/madeira); e $\varepsilon = +3,5 \pm 0,9\text{‰}$ (fungos decompositores/madeira), em um estudo com 115 espécies e 88 gêneros de ectomicorrizas, fungos decompositores de madeira e liteira, no Japão e na Malásia (KOHZU et al., 1999). Mais recentemente, Boström et al. (2008) encontraram que tanto o CO_2 respirado como os esporocarpos de 16 espécies de ectomicorrizas e fungos saprófitos, coletados em florestas da Noruega, foram sempre enriquecidos em ^{13}C em comparação com o substrato (madeira, liteira ou raízes), sendo os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e os esporocarpos positivamente correlacionados.

Diversos autores têm apontado que fungos ectomicorrízicos são naturalmente empobrecidos (2,5‰ a 4,0‰) em ^{13}C em comparação com os fungos saprófitos, e ambos são, em geral, mais enriquecidos em ^{13}C do que as folhas/substrato da espécie hospedeira (HÖGBERG et al., 1999; TAYLOR et al., 2003) (Figura 3). Essas diferenças podem refletir mais a incorporação do C da celulose enriquecida em ^{13}C na biomassa do fungo saprófito do que a incorporação da lignina e lipídios que são naturalmente empobrecidos em ^{13}C (GLEIXNER et al., 1993; HOBBIÉ et al. 2012). Por outro lado, os açúcares transportados nas árvores e assimilados pelos fungos ectomicorrízicos são provavelmente empobrecidos em ^{13}C em comparação com aqueles usados na síntese da celulose do tecido lenhoso (HOBBIÉ; WERNER, 2004; HOBBIÉ et al. 2012).

A distribuição desuniforme de ^{13}C dentro da cadeia da molécula orgânica (p. ex.: glicose) e as diferenças de metabolismos entre táxons de fungos saprófitos podem contribuir com <1‰ e >4‰ de fracionamento isotópico, respectivamente (HOBBIÉ et al., 2004).

Porém, Chalk et al. (2015a) ressaltam que, apesar de as diferenças nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre fungos saprófitos e ectomicorrízicos em relação ao substrato estarem bem documentadas, são necessários mais dados experimentais sobre a distribuição intramolecular de ^{13}C usando substratos modelos para que as variações de ^{13}C durante a decomposição sejam claramente atribuídas ao fracionamento devido ao metabolismo microbiano ou não.

A degradação microbiana de substratos simples com uma única fonte de C tem sido estudada empregando-se culturas de bactérias e fungos heterotróficos. No entanto, relativamente poucos estudos têm explorado o fracionamento de ^{13}C durante a decomposição desses substratos com uma única fonte de C, e a maioria dos estudos tem empregado glicose e *E. coli*. Duas tendências aparecem nesses estudos: a biomassa da bactéria empobrecida em ^{13}C em relação à glicose, bem como, o CO_2 respirado durante a decomposição (Figura 3); porém, os componentes intracelulares (p. ex.: lipídios vs. aminoácidos) de *E. coli* apresentam significativa heterogeneidade (CHALK et al., 2015a).

Fernandez e Cadisch (2003) observaram fracionamento de ^{13}C bem como progressivas variações na assinatura do CO_2 coletado durante a biodegradação de moléculas orgânicas (glicose, albúmen, ácido palmítico, lignina). Durante os estágios iniciais da decomposição, o CO_2 respirado foi empobrecido em ^{13}C em relação ao substrato, mas, nos estágios posteriores, o CO_2 respirado tornou-se progressivamente mais enriquecido em ^{13}C . Esse estudo não só mostrou que fungos podem discriminar seletivamente o ^{13}C quando utilizando substratos simples, mas os resultados sugeriram fortemente que o ^{13}C não estava uniformemente distribuído dentro da cadeia de C das moléculas dos substratos (CHALK et al., 2015a).

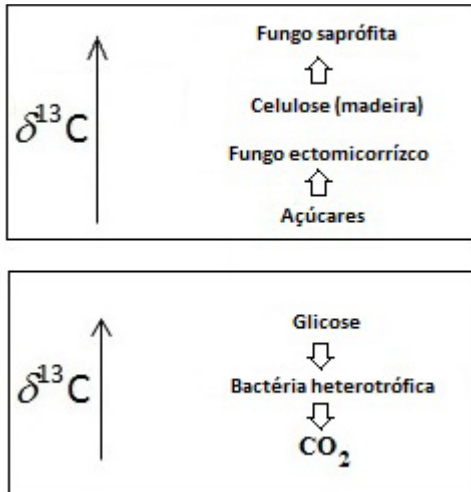


Figura 3. Diagrama esquemático mostrando as diferenças nas assinaturas de $\delta^{13}\text{C}$ de fungos saprófitos e ectomicorrízicos e os respectivos substratos, CO_2 respirado e metabólitos de bactérias heterotróficas usando glicose como substrato. Setas sólidas (↑, ↓) indicam o aumento no enriquecimento de ^{13}C . Setas abertas (↕, ⇕) indicam rotas metabólicas (Elaborado pelo autor e publicado por Chalk et al., 2015a).

Carbono Orgânico do Solo

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do carbono orgânico do solo reflete a vegetação residente mostrando variações conforme a predominância de espécies C3 ou C4 (PESSENDA et al., 2001). Mas essas assinaturas podem sofrer variações no tempo com a mudança de vegetação devido a mudanças climáticas (geológicas) ou mudança de uso do solo devido à agricultura e pecuária. Mudanças nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ em profundidade, isto é, no perfil do solo, sugerem mudança da vegetação nativa nesse solo. No Brasil, diversos estudos relacionam a introdução do cultivo de cana-de-açúcar (C4) aos valores menos negativos de $\delta^{13}\text{C}$ do carbono orgânico do solo na camada arável (30 cm) do que em profundidade (70 cm) (URQUIAGA, 2006). Equações para o cálculo de C orgânico do solo que incluem os valores de $\delta^{13}\text{C}$, além da correção em função da densidade do solo, permitem estimar a fração derivada da vegetação nativa e/ou da vegetação recentemente introduzida (p. ex.: culturas agrícolas) (SISTI et al., 2004).

Para estudar o efeito no estoque de carbono orgânico, Sisti et al. (2004) utilizaram a abundância de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) de solos (Latossolo Vermelho distrófico, Passo Fundo, RS) sob diferentes tipos de manejo agrícola – Plantio Direto (PD) e Convencional (PC), diferentes rotações de cultura com/sem adubação verde e milho em comparação com

trigo/soja. Para as rotações com milho e leguminosas, houve uma expressiva tendência de valores mais negativos de $\delta^{13}\text{C}$ abaixo de 40 cm (PD), indicando a contribuição maior do milho ($\delta^{13}\text{C} = -11,06\text{‰}$) no perfil abaixo de 30 cm. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do solo também indicaram que a decomposição do material orgânico do solo no PD não sofreu alteração com as diferentes rotações que incluíram leguminosas e milho, diferentemente dos tratamentos, em PC, onde a redução da matéria orgânica do solo foi estimulada comparada com a sequência trigo/soja (SISTI et al., 2004).

Neste experimento, a diferença de valores de $\delta^{13}\text{C}$ do solo sob vegetação nativa (solo referência) entre a camada 0-5 cm e a camada 85-100 cm de profundidade foi aproximadamente 5‰ menos negativo. Esses dados sugerem que, em tempos recentes nessa área, a vegetação foi predominantemente C3, mas houve uma proporção muito maior de espécies C4 em tempos remotos, provavelmente pastagem tropical. Situação similar foi encontrada no estudo de Vitorello et al. (1989), em Piracicaba, SP, onde os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do solo foram 8‰ menos negativos em profundidade. Portanto, a assinatura de $\delta^{13}\text{C}$ do carbono orgânico do solo pode não ser uniforme, variando com a profundidade, e, geralmente, apresentando um aumento marcado nos valores (menos negativos) de δ nas camadas superficiais com pequena mudança abaixo em maiores profundidades do perfil.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$, quando associados às frações físicas do solo, permitem avaliar as taxas de decomposição e degradação das várias frações de carbono orgânico do solo. As frações leves, ou aquelas associadas à areia, refletem a $\delta^{13}\text{C}$ do material vegetal que ingressou recentemente no perfil do solo, enquanto a fração associada à argila (C orgânico mais "humificado") apresenta valores de ^{13}C em geral maiores devido aos processos de decomposição que envolve fracionamento isotópico de ^{13}C . Assim, pode-se dizer que as frações finas (argila e silte) conservam mais o carbono originado da vegetação nativa (anterior) e que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ são indicadores potenciais para refletir a recalitrância da matéria orgânica do solo (CAMPOS, 2003).

O ingresso no solo de carbono orgânico via esterco de animais, composto orgânico ou fertilizante orgânico também pode modificar a assinatura de $\delta^{13}\text{C}$ do solo, principalmente na camada superficial. O composto orgânico (de silagem de milho) apresentou prolongado armazenamento de C (>80% do C aplicado após dois anos) nas frações não minerais de um solo arenoso (Espodosolo ferri-humilúvico órtico) em clima temperado (LYNCH et al., 2006). A aplicação desse composto orgânico (-15,1‰) produziu uma maior alteração dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (-28,4‰) na fração leve (de 1,4‰ a 9,7‰) e na fração areia (de 1,3‰ a 6,1‰) que ocorreu no solo total ou na fração argila – silte (de 0,5‰ a 3,8‰), respectivamente (LYNCH et al., 2006). Esses autores ressaltam que a maior homogeneidade dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ presente nos compostos orgânicos em relação aos materiais originais e a recalitrância do C do composto melhorou a sensibilidade da técnica de $\delta^{13}\text{C}$ em rastrear o C proveniente da entrada de insumos orgânicos (C4) no solo (C3).

Diferenciação de produtos de origem animal

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ aparecem como o indicador mais promissor para o modo de criação de ruminantes (orgânico vs. convencional, pastagem vs. confinamento) em regiões temperadas devido à relação da composição isotópica com os componentes da dieta (C3/C4), isto é, diferenças entre o grão de milho C4 abundante na dieta de criações intensivas e confinadas e pastagens C3 e leguminosas disponíveis na criação não confinada (INÁCIO; CHALK, 2017). No entanto, $\delta^{13}\text{C}$ pode ser um indicador inapropriado sob condições tropicais onde pastagens C4 são abundantes (p. ex.: *Brachiaria* spp.) (HEATON et al., 2008), e onde a criação à base de pasto (C4) é predominante em ambos os sistemas convencional e orgânico (p. ex.: Irlanda) (SCHMIDT et al., 2005).

Carne e leite (ruminantes) produzidos em sistema convencional e orgânico podem diferir significativamente em termos de valores $\delta^{13}\text{C}$ porque os padrões de produção orgânica restringem o uso de concentrados, que podem conter milho, na dieta dos ruminantes, já que é exigido em tempo mínimo de pastejo (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2016). Alguns autores têm sugerido

o limite máximo de -20‰ em carne orgânica (BONER; FÖRSTEL, 2004) e -26,5‰ para gordura do leite orgânico (MOLKENTIN, 2013). A proporção de milho (C4) na dieta pode explicar até 96% da variação do $\delta^{13}\text{C}$ no tecido capilar (SCHWERTL et al., 2005). Então, valores mais negativos de $\delta^{13}\text{C}$ são esperados para produtos orgânicos do que produtos convencionais. Essas diferenças tendem a ser menores e não significativas para aves e suínos, que têm participação essencial do milho na dieta. A maior parte dos dados científicos disponíveis é de produtos como carne, leite e ovos, bem como, tecido capilar; são escassos os dados sobre outros produtos, p. ex.: de origem suína (INÁCIO; CHALK, 2017).

^{34}S

A composição total de $\delta^{34}\text{S}$ (S orgânico + sulfato) no solo superficial varia de +1,7‰ a +18,1‰ (MIZOTA; SASAKI, 1996) e usualmente aumenta com a profundidade (NOVÁK et al., 2003). A assinatura de $\delta^{34}\text{S}$ do solo pode ser influenciada pela aplicação de fertilizantes sintéticos contendo SO_4^{2-} , gesso agrícola e enxofre elementar (S^0), bem como pela deposição atmosférica (p. ex.: água da chuva, poluição industrial). Regiões costeiras são influenciadas pelo *spray* marítimo, que possui valores de $\delta^{34}\text{S}$ ao redor de +20‰ (MIZOTA; SASAKI, 1996). As plantas adquirem o S pela extração de SO_4^{2-} da solução ou pela absorção foliar de poluentes atmosféricos tal como o SO_2 . As culturas agrícolas apresentam, em geral, valores totais de $\delta^{34}\text{S}$ variando de -3,7‰ a +10,1‰ (CAMIN et al., 2011; GEORGI et al., 2005; RAPISARDA et al., 2010; TANZ; SCHMIDT, 2010). Porém, órgãos da planta, e produtos metabólitos podem diferir de 3‰ a 6‰ do valor total de $\delta^{34}\text{S}$ (TANZ; SCHMIDT, 2010). Fertilizantes sulfatados são originados do ácido sulfúrico (de metais sulfídricos, gases sulfurosos e depósitos naturais S^0) e fontes marinhas. Os primeiros apresentam uma faixa de valores de $\delta^{34}\text{S}$ de -6,5‰ a +11,5‰, enquanto os fertilizantes derivados de fontes marinhas se aproximam de +21‰ (MIZOTA; SASAKI, 1996; VITÒRIA et al., 2004). Os depósitos naturais de S^0 têm valores de $\delta^{34}\text{S}$ na faixa de -20‰ a +15‰, enquanto o S^0 comercial varia de -5‰ a +30‰ (COPLEN et al., 2002).

Origem geográfica

A assinatura de $\delta^{34}\text{S}$ parece ser um indicador útil para determinar a

origem geográfica de alimentos, particularmente quando combinado com técnicas analíticas complementares. Produtos de natureza vegetal ou animal produzidos em regiões próximas da costa oceânica tendem a apresentar valores de $\delta^{34}\text{S}$ mais positivos devido à influência da deposição do *spray* marítimo, que contém sulfato com valores de $\delta^{34}\text{S}$ ao redor de +23‰ (CAMIN et al., 2007).

Amostras de cereais na Europa apresentaram valores de $\delta^{34}\text{S}$ mais altos em áreas de produção próximas ao Oceano Atlântico daquelas no interior, embora a concentração de sódio no grão tenha tido um maior impacto como variável (ASFAHA et al., 2011). No entanto, a média mais positiva para $\delta^{34}\text{S}$ do suco de laranja oriundo do Brasil do que da Florida (US) (RUMMEL et al., 2010) parece ter outros fatores de influência porque a maior parte (74%) da produção brasileira de laranja está no Estado de São Paulo, onde as áreas de produção estão a muitos quilômetros da costa do Atlântico. Nesse caso, a influência de outras fontes tais como o enxofre de fertilizantes e o enxofre das emissões das indústrias deveriam ser investigadas. Ressalta-se que não se encontram na literatura estudos sobre a influência de defensivos à base de sulfato de cobre, entre outros, que podem estar influenciando nos valores de $\delta^{34}\text{S}$ dos produtos vegetais.

Por outro lado, a média relativamente baixa dos valores de $\delta^{34}\text{S}$ do suco de laranja do México deve-se certamente à influência vulcânica, segundo Rummel et al., (2010). A mesma influência vulcânica foi apontada para a média baixa de $\delta^{34}\text{S}$ encontrada em amostras de carne de carneiro da Toscana e Sicília (Itália) (CAMIN et al., 2007).

Considerando que os valores de $\delta^{34}\text{S}$ dos fertilizantes estão na faixa de -4,9‰ a +21,6‰ (MIZOTA; SASAKI, 1996); na maioria dos casos, a influência do *spray* marítimo parece encobrir o sinal de composição isotópica do fertilizante fonte de S nas plantas e produtos derivados. As taxas de aplicação de S em solos agrícolas são cerca de dez vezes menores que as taxas de nitrogênio, o que ajuda a explicar a maior influência da composição isotópica dos fertilizantes nitrogenados nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ em plantas (veja próxima seção).

A influência do *spray* marítimo (proximidade com a costa) na variabilidade dos valores de $\delta^{34}\text{S}$ tem sido observada em mel de abelha (SCHELLENBERG et al. 2010), leite de vaca (BONTEMPO et al., 2011; CRITTENDEN et al., 2007), queijo (CAMIN et al., 2012; MANCA et al., 2006; PILLONEL et al., 2005) e manteiga (ROSSMANN et al., 2000), carne de carneiro (CAMIN et al., 2007) e lã de ovelha (ZAZOO et al., 2011). O leite da Austrália apresentou valores mais altos de $\delta^{34}\text{S}$ (+9‰ a +15‰) daqueles oriundos da Europa (+3‰ a +8‰) (CRITTENDEN et al., 2007) e o queijo de regiões alpinas da Europa apresentou valores menores (+3,8‰) que aqueles de áreas próximas ao oceano, tais como Sardenha (Itália) (+9,1‰) (CAMIN et al., 2004). No entanto, Zazzo et al. (2011) encontraram que a relação entre os valores de $\delta^{34}\text{S}$ (lã de ovelha) e a distância da costa (em km) pode não ser significativa dependendo da direção do vento predominante da região, combinado com a influência das fontes atmosféricas de deposição de enxofre. Além disso, apesar da forte relação entre a variação da composição isotópica de produtos de origem vegetal e animal com a “distância da costa”, a literatura científica recente (p. ex.: et al., 2011) tem ressaltado o papel da combinação da análise de multi-isotópica (p. ex.: ^{18}O and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) e/ou a análise da concentração de elementos químicos para designação da origem geográfica de produtos alimentícios.

Modos de produção

Enquanto a aplicação de fertilizantes sulfatados industrializados é limitada na agricultura orgânica (exceto sulfato de potássio), enxofre elementar (S^0) de fonte nativa ou comercial é permitido para o controle de pragas e doenças e como insumo para o solo (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2016). Portanto, para que a assinatura de $\delta^{34}\text{S}$ seja capaz de discriminar o modo de produção, cultivos convencionais teriam que usar fertilizantes sulfatados e/ou S^0 que diferem de forma significativa nos valores de $\delta^{34}\text{S}$ comparado com fontes orgânicas de S e/ou S^0 usado nos cultivos orgânicos. Devido à sobreposição parcial em formas de S permitidas na agricultura orgânica e na convencional, bem como a sobreposição das assinaturas de $\delta^{34}\text{S}$ de várias fontes de SO_4^{2-} e S^0 , junto com os fatores de confundimento da proximidade com oceanos ou áreas industriais, é altamente improvável

que os valores de $\delta^{34}\text{S}$ de produtos agrícolas diferenciem esses dois modos de produção (INÁCIO et al., 2015a; INÁCIO; CHALK, 2017).

Portanto, os valores de $\delta^{34}\text{S}$ em plantas não podem distinguir entre modos de produção ou tipo de fertilizante aplicado (RAPISARDA et al., 2010), mas apresentam relação com a origem geográfica devido às diferentes condições geológicas e da formação do solo (CAMIN et al., 2011; GEORGI et al., 2005; SCHMIDT et al., 2005; TANZ; SCHMIDT, 2010). A mesma situação ocorreu para a assinatura de $\delta^{34}\text{S}$ de leite de vaca (MOLKENTIN, 2007, 2010; GIESEMANN, 2010). Poucos estudos (p. ex.: GONZÁLEZ-MARTIN et al., 2001) apontaram o isótopo ^{34}S como um indicador útil do sistema de produção (suíno ibérico, alimentado com castanhas – *acorn nuts*) ou sob dietas experimentais (algas marinhas) (BAHAR et al., 2009) e de dieta pré-abate em animais (OSORIO et al., 2011). Novamente, Zazzo et al. (2011) encontrou que os valores de $\delta^{34}\text{S}$ no pelo de animais foi um indicador da proximidade com o oceano. Porém, uma atenção especial deve ser dada à possibilidade da adição de conservantes contendo S nos alimentos e bebidas, podendo variar de +2,5‰ a +13,7‰ (KELLY et al., 2002) e, assim, confundir a interpretação da assinatura de $\delta^{34}\text{S}$ em produtos alimentícios.

Fertilizantes com enxofre (^{34}S)

Análogo ao uso de fertilizantes sintéticos enriquecidos com ^{15}N (ver item específico), a estimativa de eficiência de fertilizantes com enxofre também pode ser feita diretamente usando fertilizantes marcados com ^{34}S . Podem ser usados fertilizantes enriquecidos ou empobrecidos em ^{34}S , sendo que este último tem a vantagem do menor custo, porém com uma extensão isotópica bem menor (CHALK et al. 2017) do que os materiais enriquecidos. A proporção (P) de S da planta derivado do fertilizante marcado segue a Equação 8:

$$P = \frac{A_{\text{planta}(+S)} - A_{\text{planta}(-S)}}{A_{\text{fertilizante}} - 0,0425} \quad (8)$$

Onde A é a fração atômica expressa de ^{34}S , com (+S) e sem (-S) o fertilizante.

O uso da abundância natural de ^{34}S já foi empregada para estudar a recuperação no solo, mas o estudo foi baseado na premissa de que não há fracionamento isotópico significativo durante as transformações de S no solo (CHALK et al., 2017), sem, no entanto, ter aplicado um método para medir a magnitude desse fracionamento.

^2H e ^{18}O

A composição de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ da água meteórica (chuva) segue um padrão geográfico previsível que está relacionado à latitude, à altitude, à distância da costa e à quantidade de precipitação local (DANSGAARD, 1964). A composição de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ da água meteórica é afetada por fenômenos físicos tais como a condensação e a evaporação. A temperatura é a principal variável que influencia inversamente o fracionamento isotópico de ^2H e ^{18}O (DANSGAARD, 1964; GAT et al., 1996). A água dos oceanos é definida com valor 0‰ para cada isótopo, e valores empobrecidos (negativos) de δ são medidos na água meteórica e no vapor de água dos oceanos, enquanto valores relativamente enriquecidos de δ são esperados para corpos d'água tais como lagos (GAT, 1996). A média anual de $\delta^{18}\text{O}$ na água meteórica varia de +2‰ a -2‰ nas regiões equatoriais até valores tão baixos quanto -22‰ nas regiões polares (GAT, 1996).

Durante a aquisição de água do solo pelas plantas terrestres, não há fracionamento isotópico. Portanto, a água presente no caule apresenta a mesma composição isotópica da fonte de água – isto é, água superficial versus água de camadas mais profundas no solo (DAWSON et al., 2002). No entanto, devido à transpiração nas folhas, a água é enriquecida em ^2H e ^{18}O , em comparação com a água superficial do solo (DAWSON et al., 2002). Plantas C4 podem ser enriquecidas em $\delta^{18}\text{O}$ em comparação com plantas C3, com pequenas diferenças (<1‰) em climas frios e úmidos, mas com grandes diferenças (10‰) em climas quentes e regiões semiáridas (KOHN, 1996). Portanto, considerando a complexidade da distribuição dos isótopos estáveis de H e O no *continuum* solo-planta-atmosfera devido às diferenças na localização e clima, é altamente improvável que as assinaturas de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ em plantas possam diferenciar modos de produção (INÁCIO

et al., 2015a). No entanto, esses marcadores isotópicos têm tido uma importante aplicação na verificação da origem geográfica (LUYKX; VAN RUTH, 2008).

Por outro lado, Chesson et al. (2010) encontraram correlação altamente significativa ($r^2 > 0,99$) para ambos os valores de abundância relativa ($\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$) entre amostras pareadas de leite de vaca e a água de bebedouros em oito localidades dos EUA, dentro de uma faixa de $\delta^2\text{H}_{\text{leite}}$ de -11‰ a 0‰ , $\delta^2\text{H}_{\text{água}}$ de -12‰ a 0‰ , $\delta^{18}\text{O}_{\text{leite}}$ de -12‰ a -1‰ e $\delta^{18}\text{O}_{\text{água}}$ de -15‰ a -2‰ . Vários autores têm demonstrado que as assinaturas de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de carne bovina são ferramentas potenciais para prever a origem geográfica, entre países (p. ex.: Heaton et al., 2008) e mesmo de regiões dentro de um mesmo país (p. ex.: Nakashita et al., 2008), como uma consequência da relação direta entre as assinaturas isotópica da água fornecida e a dieta dos animais aos padrões geográficos da água meteórica.

Os valores de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de animais mantidos em pastagens ou alimentados com pastagem fresca refletem mais a água livre nas folhas dos vegetais (isto é, enriquecido em ^{18}O) que a assinatura isotópica da água bebida pelos animais (BIONDI et al., 2013; RENOUE et al., 2004). Além disso, para a mesma origem geográfica, o alto enriquecimento de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ na água presente no tecido animal pode indicar o gado alimentado com biomassa cuja composição isotópica é influenciada pelas variações (anuais ou sazonais) na precipitação (BONER; FÖRSTEL, 2004). O baixo conteúdo de água dos concentrados (p. ex.: milho), silagens e forragens secas, em comparação com as pastagens frescas, resulta no aumento de ingestão de água pelos animais, o que irá influenciar a composição isotópica do tecido e produtos animais mais do que os componentes de dieta (BIONDI et al., 2013; BONER; FÖRSTEL, 2004).

^{15}N

Aplicação Agronômica da Abundância Absoluta (x) de ^{15}N Fertilizantes marcados com ^{15}N

O uso de fertilizantes marcados com ^{15}N , em geral ^{15}N -ureia e

^{15}N -sulfato de amônio, possibilita a determinação da recuperação do N no sistema solo-planta. A proporção de ^{15}N do fertilizante enriquecido recuperada pela planta é calculada aplicando a Equação 9:

$$\text{Proporção de N recuperado}_{\text{planta}} = \frac{\text{massa N}_{\text{planta}} \times x^E (^{15}\text{N})_{\text{planta}}}{\text{massa N}_{\text{fertilizante}} \times x^E (^{15}\text{N})_{\text{fertilizante}}} \quad (9)$$

Onde, $\frac{x^E (^{15}\text{N})_{\text{planta}}}{x^E (^{15}\text{N})_{\text{fertilizante}}}$ é a fração do N da planta derivado do fertilizante.

O mesmo procedimento é utilizado para calcular a recuperação do fertilizante no solo, e a perda do fertilizante do sistema solo-planta pode ser calculada por balanço de massa. Os estudos de eficiência do uso do N também têm sido feitos com compostos orgânicos (CHALK et al., 2013), estercos de animais (CHALK et al., 2014) e com fertilizantes de liberação lenta ou controlada enriquecidos em ^{15}N (CHALK et al., 2015b). A Figura 4 ilustra os passos para obtenção e uso de materiais orgânicos marcados com ^{15}N , tais como esterco de animais, adubos-verdes e compostos orgânicos.

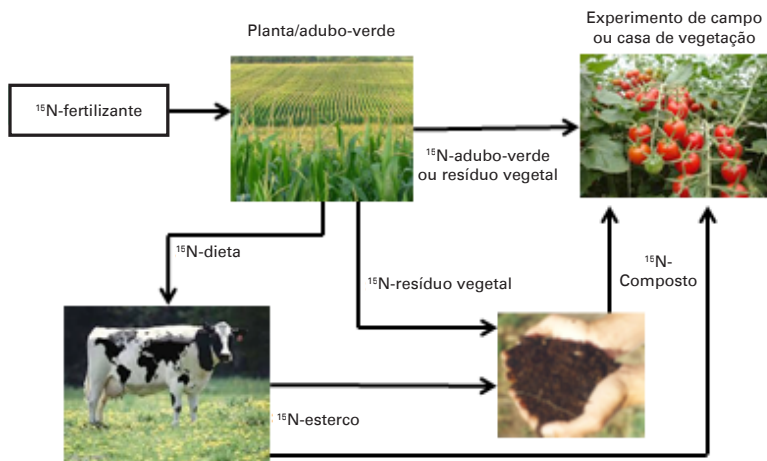


Figura 4. Passos para obtenção de materiais orgânicos marcados com ^{15}N e sua aplicação em estudos de eficiência como fertilizante (fonte de N). Fotos disponíveis no Google Image®.

Trabalhos envolvendo o isótopo estável de ^{15}N para estudo da dinâmica de N no solo após a aplicação de fertilizantes orgânicos foram temas das revisões de Dittert et al. (1998) e Chalk et al. (2013). Técnicas envolvendo materiais marcados com ^{15}N permitem separar o N do material orgânico (ou do fertilizante) do N do solo que é aproveitado (ou recuperado) pela planta.

CHALK et al. (2013) avaliaram a informação publicada sobre o valor como fonte de N de compostos orgânicos e encontraram uma variação muito grande nos resultados para a recuperação de N pela planta, cobrindo uma faixa de ~4% a 38% de recuperação e ^{15}N (Recp. ^{15}N). Dentre os trabalhos avaliados por aqueles autores, os desenhos experimentais, as diferentes culturas e as características do composto orgânico foram muito variáveis.

Os dados compilados por CHALK et al. (2013) mostram uma média de recuperação de ^{15}N igual a 12,6% (IC95% = 9,8% a 15,2%) e uma ampla dispersão. A recuperação de N se mostrou inversamente relacionada à relação C:N do composto, porém foi positivamente relacionada ao aumento da quantidade de N aplicado em forma de composto orgânico. As diferenças marcantes observadas entre os estudos dependem de vários fatores independentes ou fatores com interações, incluindo a uniformidade de marcação, a qualidade do composto e a taxa de aplicação, bem como as propriedades do solo e condições ambientais (CHALK et al. 2013). Alguns estudos envolveram cultivo em solo alagado, condição que representa marcadas diferenças na dinâmica de N. Em geral, as recuperações baixas (p. ex.: <10%) estão associadas a compostos pobres em qualidade (alta C:N) tais como aqueles derivados de palha de arroz ou esterco compostado com serragem. A alta recuperação de N (27%–29%) foi observada quando o composto tinha boa qualidade (C:N \approx 12) e foi aplicado em altas taxas (31–34 g N m⁻²) na cultura de arroz em cultivo inundado (CHALK et al., 2013).

Olesen et al. (2004) relataram resultados de experimentos com cevada e trigo conduzidos entre 1994 e 2002 (Dinamarca), os quais incluíram dejetos (fezes e urinas de ruminantes e suínos) marcados com ^{15}N .

A recuperação de ^{15}N pelas culturas foi bastante variável conforme o tipo de esterco, variando de 9% a 47% para o ano de aplicação, sendo menor nos dois anos seguintes, com aproveitamento residual de 2,5% a 6% e 1,1% a 2,5%, respectivamente.

O aproveitamento do N (^{15}N) de esterco de gado leiteiro aplicado ao solo foi de 14% a 16% no primeiro ano e 6% a 8% no segundo ano de cultivo de milho (MUNÓZ et al., 2004; POWELL et al., 2005). Para 3 anos de cultivo, uma média de 18% do N (^{15}N) do esterco foram aproveitados pela planta e 46% permaneceram no solo. Diversos autores apontam que uma parcela significativa do N aplicado (30% a 80%) na forma de esterco, composto ou adubos-verdes pode ficar retida no solo por até 3 anos (ARAÚJO et al., 2011; CELANO et al., 2012; GARZA et al., 2009; MUNÓZ et al., 2003; THÖNNISSEN et al., 2000).

Em resumo, os estudos com ^{15}N demonstram que os diferentes tipos de fertilizantes orgânicos apresentam grande variação de eficiência de uso, podendo ser <10% a >40% do N aplicado. O composto orgânico apresenta uma consistente, porém baixa, eficiência média de recuperação (8%–12%), e o aproveitamento de esterco de animais apresenta alta variação de valores de eficiência (14%–47%).

Estimativa da fixação biológica de nitrogênio (FBN) por diluição isotópica

O método da diluição isotópica ou enriquecimento de ^{15}N (E) tem sido largamente utilizado para estimar a dependência proporcional de leguminosas da fixação biológica de N_2 (FBN), em outras palavras, estimar a contribuição do N da fixação biológica à nutrição da planta. O método é baseado no enriquecimento em ^{15}N do solo com um fertilizante marcado e o uso de parcelas pareadas, uma contendo a leguminosa fixadora de N_2 e outra com uma planta de referência não fixadora (UNKOVICH et al., 2008). As diferenças entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de leguminosas e as plantas de referência variam com a espécie, o grau de dependência à fixação de N_2 e os valores de $\delta^{15}\text{N}$ disponível no solo. No entanto, as diferenças registradas podem chegar a 16,4‰ para pastagens (CHALK et al., 2016). Já Oberson et al. (2007)

apresentaram diferenças entre plantas de soja (leguminosa) e plantas daninhas (referência) entre 4,4‰ a 7,5‰.

A dependência proporcional (P_{atm}) da leguminosa da FBN é estimada conforme a equação:

$$P_{atm}(E) = 1 - \frac{x^E(^{15}\text{N})_{\text{leguminosa}}}{x^E(^{15}\text{N})_{\text{planta de referência}}} \quad (10)$$

Os valores de P_{atm} estão numa escala de 0 a 1. Foram reportadas estimativas de FBN (P_{atm}) variando de 0,15 para soja (OBERSON et al., 2007) até 0,99 para trevo-vermelho (HUSS-DANELL; CHAIA, 2005) utilizando o enriquecimento com ^{15}N .

Aplicação Agronômica da Abundância Relativa (δ) de ^{15}N Fracionamento de ^{15}N influenciando os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de fertilizantes orgânicos

Fertilizantes nitrogenados sintéticos (p. ex.: sais de amônio e ureia) são derivados da amônia (NH_3) produzida pelo processo Haber-Bosch, o qual envolve a redução catalítica do N_2 atmosférico a alta temperatura e pressão por H_2 derivado do metano ou do gás natural. Portanto, os fertilizantes sintéticos possuem assinatura de $\delta^{15}\text{N}$ próxima ao N_2 atmosférico (por definição $\delta^{15}\text{N} = 0\text{‰}$). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ para os fertilizantes sintéticos nitrogenados reportados na literatura se situam frequentemente entre -3,9‰ a +5,9‰ (INÁCIO et al., 2015a).

Fertilizantes orgânicos (que contêm N) são naturalmente enriquecidos (mais positivos) no isótopo estável ^{15}N quando comparados aos fertilizantes sintéticos. No entanto, as frações de N, como NH_4^+ e NO_3^- , podem ter valores diferentes devido ao fracionamento isotópico durante o armazenamento do esterco ou mesmo durante a compostagem.

Volatilização de amônia, nitrificação e a redução dissimilatória de NO_3^- (desnitrificação biológica) são os principais processos que

afetam a abundância natural de ^{15}N dos principais fertilizantes orgânicos, esterco de animais e composto orgânico (HÖGBERG, 1997; ROBINSON, 2001). A volatilização de NH_3 é a rota de perda de N mais importante do esterco armazenado ou depositado, bem como durante a compostagem, e envolve várias etapas nas quais o fracionamento isotópico ocorre. Essas etapas (i – iv) foram descritas por Högberg (1997), como segue:

(i) Efeito do equilíbrio ($\text{A} \leftrightarrow \text{B}$ na solução).



NH_4^+ é mais enriquecido em ^{15}N que NH_3 no equilíbrio químico ($\alpha = 1.020\text{--}1.027$).

(ii) Efeito cinético.

1. Difusão da NH_3 em solução para o local de volatilização ($\alpha \approx 1.000$).

2. Volatilização de NH_3 ($\alpha = 1.029$).

3. Difusão da NH_3 para fora do local de volatilização ($\alpha \approx 1.000$).

A primeira etapa da nitrificação, a oxidação enzimática do NH_4^+ a NO_2^- , mostrou ter forte efeito de fracionamento ($\alpha = 1,015$ a $1,036$) em culturas puras de *Nitrosomonas* (HÖGBERG, 1997). Já a desnitrificação pode ser um importante processo de fracionamento isotópico no esterco depositado (p. ex.: na pastagem) ou armazenado ou mesmo na compostagem. O processo completo de desnitrificação ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \uparrow \rightarrow \text{N}_2 \uparrow$) tem um fator de fracionamento entre $1,028 - 1,033$ (ROBINSON, 2001) ou maior (Tabela 3).

Yun e Ro (2009) apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}$ para NH_4^+ e NO_3^- de $+22,4\%$ e $+16,5\%$, respectivamente, em um composto feito de serragem madeira e esterco de suíno. De modo similar, a excreção animal consiste de fração sólida (esterco) e líquida (urina), exceto para frangos onde não há urina. O esterco e a urina apresentam, em geral, diferenças grandes nos valores de δ^{15} . Frequentemente, a urina

é empobrecida em ^{15}N em relação ao alimento que o animal ingeriu e ao esterco com valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre $-1,6\text{‰}$ a $+4,1\text{‰}$ (CHALK et al., 2014). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ podem ser tanto positivos quanto negativos para urina, enquanto os valores foram sempre positivos, no esterco de gado leiteiro (CHENG et al., 2011). A urina foi invariavelmente empobrecida em $\delta^{15}\text{N}$ em relação ao alimento dado ao gado, enquanto o esterco foi similar ou enriquecida em relação à dieta do animal. Além disso, relação linear e altamente significativa foi encontrada entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ do alimento ($+2\text{‰}$ a $+8,5\text{‰}$) e as fezes ($+4\text{‰}$ a $+9\text{‰}$) (CHENG et al., 2011).

Tabela 3. Fatores de discriminação (ϵ) para os processos do ciclo do nitrogênio.

Processo	Discriminação (‰)	
	Högberg (1997) ¹	Robinson (2001)
Amonificação ($\text{N orgânico} \rightarrow \text{NH}_4^+$)	≈ 0	0–5
Nitrificação ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)	15–35	15–35
Volatilização ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3\uparrow$)	29	40–60
Desnitrificação ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}\uparrow \rightarrow \text{N}_2\uparrow$)	0–33	28–33
Produção de N_2O e NO durante a oxidação de NH_4^+		35–60
Fixação biológica de N_2	0–2	0–6
Assimilação de N inorgânico pelas plantas	0–20	0–19 (NO_3^-) 9–18 (NH_4^+)

Nota: $\epsilon = (\alpha - 1) \times 1.000$.

Os esterco de animais são naturalmente enriquecidos em ^{15}N devido aos processos de fracionamento isotópico, tais como a volatilização e NH_3 e a desnitrificação que ocorrem durante o armazenamento do esterco ou durante a compostagem de resíduos orgânicos (CHALK et al., 2014). Tanto NH_3 quanto N_2O perdidos são empobrecidos em ^{15}N . Hristov et al. (2009) encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ para NH_3 volatilizada de -31‰ (1 dia) a -15‰ (14 dias) durante a incubação de esterco de bovinos. Igualmente, Maeda et al. (2010) encontraram valores de ^{15}N para NH_3 de -20‰ (15 dias) a -15‰ (45 dias) durante a compostagem de esterco bovino. Como consequência das perdas de N empobrecido em ^{15}N (valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$), o N remanescente torna-se

enriquecido em ^{15}N . Por exemplo, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ da silagem de milho aumentaram +7,9‰ durante a compostagem (LYNCH et al., 2006) e aumentos similares foram observados para a compostagem de esterco de bovinos e serragem (Tabela 4).

No entanto, relação linear fraca foi encontrada entre as concentrações de N e os valores de $\delta^{15}\text{N}$ do composto de esterco de gado ($r^2 = 0,16$, $p < 0,05$) numa faixa de 10 g a 35 g N kg^{-1} e $\delta^{15}\text{N}$ de +9‰ a +22‰ (LIM et al., 2010). De fato, o valor de $\delta^{15}\text{N}$ *per se* não é indicador de esterco ou composto orgânico com alta ou baixa concentração de N. Somente, a diferença entre $\delta^{15}\text{N}$ no tempo ($\delta^{15}\text{N}_{\text{inicial}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{final}}$) pode indicar a magnitude de perdas de N do esterco armazenado ou da compostagem. Por exemplo, valores de ^{15}N aumentaram significativamente durante a compostagem de esterco de cavalo e esterco bovino com torta de pinhão manso, em biorreatores de bancada, mas esse aumento não foi observado em outras misturas que tiveram menor perda de N calculado pelo balanço de massa (Figura 5) (INÁCIO et al., 2017).

Tabela 4. Abundância natural de ^{15}N de resíduos agrícolas e dos compostos derivados.

Referência	Resíduo	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$
Kim et al., 2008	Esterco bovino	+7,6
	Composto de esterco bovino + casca de arroz ^a	+11,0
	Esterco bovino	+11,4
	Composto de esterco bovino + serragem ^b	+15,6
Lynch et al., 2006	Silagem de milho	+0,3 ± 1,3
	Composto de silagem de milho	+8,2 ± 0,4

^a $\delta^{15}\text{N}$ da casca de arroz = +4,9±0,1‰.

^b $\delta^{15}\text{N}$ da serragem = +1,7±0,2‰.

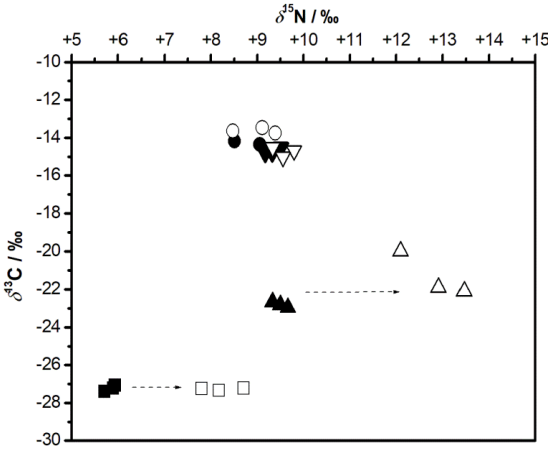


Figura 5. Deslocamento da abundância relativa de ^{13}C e ^{15}N durante a compostagem de diferentes resíduos orgânicos (INÁCIO et al., 2017). Maior deslocamento de $\delta^{15}\text{N}$ indica maior perda de N total.

A abundância natural de ^{15}N também foi proposta como ferramenta para estimar a recuperação de N de esterco de animais e compostos orgânicos. Os valores geralmente mais positivos de $\delta^{15}\text{N}$ dos esterco, e o produto da compostagem em relação aos solos permite uma estimativa qualitativa do aproveitamento do N pela planta. No entanto, Inácio et al. (2015) e Inácio et al. (2016) propuseram uma abordagem quantitativa (equação abaixo) em um experimento com doses de composto e hortaliças (alface, cenoura e brócolis), onde a ausência de um fracionamento isotópico significativo (fracionamento médio = 0‰) pôde ser verificada. Essa abordagem ainda necessita ser rigorosamente testada mais vezes, e terá maior êxito com diferenças maiores entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ do solo e do fertilizante orgânico, além de exigir um r^2 obrigatoriamente alto e significativo para a resposta da planta às doses (Equação 11).

$$P_c = \frac{\delta_{\text{planta}+} - \delta_{\text{planta-}}}{\delta_{\text{composto}} - \delta_{\text{solo}}} \quad (11)$$

Onde δ é o valor da abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), da planta com (+) e sem (-) a aplicação do composto orgânico. No denominador estão os valores de $\delta^{15}\text{N}$ do composto e do solo.

Diferenciação de produtos de origem vegetal e animal

O valor de $\delta^{15}\text{N}$ de produtos vegetais tem sido apontado como um marcador promissor para diferenciar hortaliças, frutas e grãos oriundos da agricultura orgânica ou convencional, já que os fertilizantes orgânicos (esterco e composto) e os nitrogenados sintéticos (p. ex.: ureia) diferem acentuadamente quanto à assinatura de $\delta^{15}\text{N}$. Quanto maior a diferença nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre os fertilizantes orgânico e sintético, mais robusta será a diferenciação dos produtos vegetais adubados com essas fontes de N. No entanto, diferentes culturas agrícolas mostram maiores ou menores diferenças entre valores de $\delta^{15}\text{N}$ de produtos orgânicos ou convencionais e certo grau de sobreposição pode ocorrer.

Tomates orgânicos mostraram grande diferença nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ comparados com a produção convencional ($+8,1\pm 3,2\%$ vs. $-0,1\pm 2,1\%$, respectivamente) enquanto diferenças entre alfaces foram menores ($+7,6\pm 4,1\%$ vs. $+2,9\pm 4,3\%$, respectivamente), embora ainda estatisticamente significativas; no entanto, valores de $\delta^{15}\text{N}$ de cenouras orgânicas e convencionais ($+5,7\pm 3,5\%$ vs. $+4,1\pm 2,6\%$) não diferiram estatisticamente (BATEMAN et al., 2007). Cultivos perenes, tais como frutos de laranja (orgânico = $+7,3\%$ a $+7,9\%$ vs. convencional = $+5,1\%$ a $+6,1\%$), tendem a mostrar menores, porém significativas, diferenças nos valores de $\delta^{15}\text{N}$, entre modos de produção (CAMIN et al., 2011). Contudo, vários fatores de produção ou externos podem confundir a designação do produto, p. ex.: (i) produtos de leguminosas (soja) ou o uso de leguminosas como adubos-verde em cultivos orgânicos, (ii) culturas agrícolas com baixo requerimento de N, (iii) hábito de crescimento perene, anual ou ciclo curto, (iv) uso de fertilizantes orgânicos em cultivos convencionais, e (v) a venda de produtos orgânicos como produtos convencionais (INÁCIO et al., 2015a).

No Brasil, Inácio et al. (2015) avaliaram os valores de $\delta^{15}\text{N}$ dois sistemas orgânicos, com ($+14,3\pm 1,0\%$) e sem ($+9,2\pm 1,1\%$) uso de esterco de animais como fonte de N, um sistema convencional ($+8,5\pm 2,7\%$), que usa fertilizante sintético e esterco, e um sistema hidropônico de produção de alface. Os resultados mostraram que sistemas orgânicos

podem se diferenciar significativamente devido às diferentes fontes orgânicas disponíveis, que apresentam ampla faixa de variação (0,0‰ a +14,9‰). Além disso, houve sobreposição de valores de $\delta^{15}\text{N}$ de alface orgânica e convencional quando o sistema orgânico não utiliza esterco de animais, para fertilização direta ou compostagem, que possuem valores positivos elevados de $\delta^{15}\text{N}$. O uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos por produtores convencionais reduziu significativamente os valores de $\delta^{15}\text{N}$ mesmo quando aplicado esterco animal, diferenciando do sistema orgânico que exclui o fertilizante sintético. Esses autores observaram que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de alface encontrados foram invariavelmente maiores do que os relatados na literatura (dados de clima temperado). Tal resultado pode ser atribuído a maior intensidade nas transformações e perdas de N no agroecossistema tropical (INÁCIO et al., 2015).

Para produtos de origem animal (carne, leite, ovos, etc.), o valor de $\delta^{15}\text{N}$ não é apontado como um marcador promissor para diferenciar produtos (leite e carne) orgânicos e convencionais (INÁCIO; CHALK, 2017), apesar de alguns autores terem reportado que o leite convencional apresentou predominantemente valores mais altos de $\delta^{15}\text{N}$ que a contraparte orgânica (Europa) (MOLKENTIN, 2013). São muitos os fatores que podem influenciar e confundir a diferenciação entre modos de produção, como a composição e a digestibilidade da dieta (C3 vs. C4, leguminosas, silagem, pasto, etc), especificidade do tecido animal (ou componente), ciclo metabólico, taxa de crescimento e idade do animal, e, por fim, o balanço de N no nível da propriedade agrícola (INÁCIO; CHALK, 2017). Por outro lado, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ são indicadores da administração de rações com componentes de origem animal (que contenham N). Como componentes de ração de origem animal (p. ex.: farinha de osso e carne de bovinos) possuem valores de $\delta^{15}\text{N}$ invariavelmente mais altos que os componentes de origem vegetal, a assinatura dessa fonte de proteína (N) na ração é refletida diretamente nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ dos tecidos (p. ex.: frango) e produtos do animal (p. ex.: ovos e carne) (CARRIJO et al., 2006; DENADAI et al., 2008; COLETTA et al., 2012).

Estimativa da FBN por abundância natural

O uso da abundância natural de ^{15}N (AN) para estimar a FBN em leguminosas é mais recente comparado com o método de enriquecimento. Esse método não requer o uso de fertilizantes marcados, porém, também necessita do uso de uma planta de referência não fixadora. Adicionalmente, o método requer a determinação do fracionamento isotópico que ocorre durante a FBN (UNKOVICH et al., 2008). O fracionamento isotópico é determinado cultivando a espécie leguminosa (fixadora) em um meio livre de N. Esse procedimento resulta no valor $B/\text{‰}$ que é aplicado na Equação 12:

$$P_{\text{atm}}(\text{AN}) = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{planta de referência}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{leguminosa}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{planta de referência}} - B} \quad (12)$$

No entanto, Chalk et al. (2016) apontam para uma expressiva falta de consistência entre os métodos de diluição isotópica e o método da abundância natural de ^{15}N para estimar a FBN, apesar da correlação significativa (Figura 6), quando comparados em experimentos simultâneos.

Esses autores calcularam que a probabilidade dos métodos darem estimativas similares, isto é, -5 a +5 pontos percentuais de diferença entre as estimativas calculadas para três grupos de espécies (pastagens, grãos e arbóreas perenes), é aproximadamente de apenas 30%. As principais razões para essas discrepâncias residem na obtenção do valor B, no uso das plantas de referência e na variação espacial e temporal da distribuição dos isótopos de N. Porém, os autores sustentam que a planta de referência deve ser eliminada e substituída por outras abordagens. Por exemplo, como as propostas que incluem a (i) acomodação de equações exponenciais aos dados experimentais do declínio temporal do enriquecimento de ^{15}N no solo (Chalk et al, 1996) e (ii) do uso da correlação linear entre a diferença ($\Delta^{15}\text{N}$) de valores de $\delta^{15}\text{N}$ da parte aérea (soja) e dos nódulos ($\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{parte aérea}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{raiz nodulada}}$) com as estimativas (P_{atm}) utilizando plantas de referência (Wanek; Arndt, 2002). Anteriormente, Chalk e Ladha (1999) já haviam apontado a planta de referência como o “calcanhar de aquiles” da metodologia com ^{15}N .

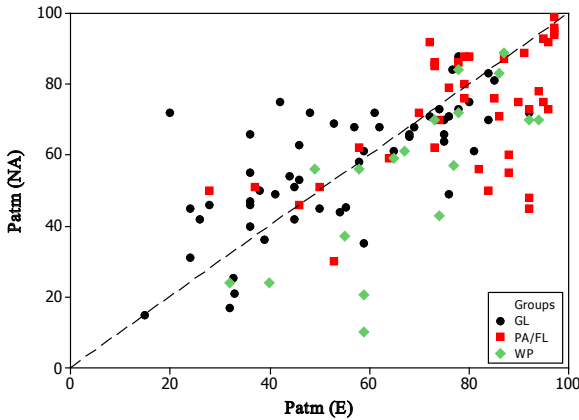


Figura 6. Gráfico de dispersão de P_{atm} (E) vs. P_{atm} (AN). A linha tracejada representa a fronteira hipotética ao longo da qual as estimativas seriam iguais (isto é, P_{atm} (E) = P_{atm} (NA)). A dispersão dos pontos ao redor da linha mostra a magnitude da discrepância entre as estimativas. GL, grãos leguminosos; PA/FL, pastagens e forragens leguminosas; WP, arbóreas perenes (CHALK et al., 2016).

Conclusões

As variações na abundância natural dos isótopos estáveis dos principais elementos envolvidos nos ciclos biogênicos têm sido objeto de estudo por décadas e a aplicação desta técnica tem se ampliado com o aumento da precisão dos equipamentos para análise da razão isotópica. A análise de isótopos estáveis tem demonstrado ter aplicações de enorme relevância no campo da ciência básica (p. ex.: fisiologia) ou no campo da aplicação com fins mercadológicos (p. ex.: análises forenses, certificação). Especialmente na agricultura, essa abrangência de aplicações, do conhecimento básico ao aplicado, ganha maior relevância já que a produção de alimentos passa por diversas mudanças para atender a requisitos ambientais (sustentabilidade) e mercadológicos (globalização, aumento da produção, agregação de valor e denominação de origem). O estudo do N na agricultura sempre foi de extrema relevância, pela sua importância na nutrição de plantas e sua alta mobilidade nos ecossistemas. Nesse sentido, os estudos com ^{15}N , especialmente em abundância natural, são uma ferramenta de pesquisa que nos traz informações importantes sobre a dinâmica do N nos agroecossistemas e ecossistemas naturais. Portanto, a tendência é que as análises de isótopos estáveis se tornem cada vez mais corriqueiras nos trabalhos científicos e como serviço disponível à sociedade.

Referências

ARAÚJO, E.S.; GUERRA, J.G.M., ESPINDOLA, J.A.A., URQUIAGA, S., BODDEY, R.M., MARTELETTO, L.A.P., ALVES, B.J.R. Recuperação no sistema solo-planta de nitrogênio derivado da adubação verde aplicada à cultura do repolho.

Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, DF, v. 46, n.7, p. 729-735, 2011.

ASFAHA, D. G.; QUÉTEL, C. R.; THOMAS, F.; HORACEK, M.; WIMMER, B.; HEISS, G.; DEKANT, C.; DETERS-ITZELSBERGER, P.; HOELZL, S.; RUMMEL, S.; BRACH-PAPA, C.; VAN BOCKSTAELE, M.; JAMIN, E.; BAXTER, M.; HEINRICH, K.; KELLY, S.; BERTOLDI, D.; BONTEMPO, L.; CAMIN, F.; LARCHER, R.; PERINI, M.; ROSSMANN, A.; SCHELLENBERG, A.; SCHLICHT, C.; FROESCHL, H.; HOOGWERFF, J.; UECKERMANN, H. Combining isotopic signatures of $n(^{87}\text{Sr})/n(^{86}\text{Sr})$ and light stable elements (C, N, O, S) with multi-elemental profiling for the authentication of provenance of European cereal samples. **Journal of Cereal Science**, Philadelphia, v. 53, p. 170-177, 2011.

BAHAR, B.; MOLONEY, A. P.; MONAHAN, F. J.; HARRISON, S. M.; ZAZZO, A.; SCRIMGEOUR, C. M.; BEGLEY, I. S.; SCHMIDT, O. Turnover of carbon, nitrogen, and sulfur in bovine *longissimus dorsi* and *psaos major* muscles: Implications for isotopic authentication of meat. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 905-913, 2009.

BATEMAN, A. S.; KELLY, S. D.; WOOLFE, M. Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, 2664-2670, 2007.

BENNER, R.; FOGEL, M. L.; SPRAGUE, E. K.; HODSON, R. E. Depletion of ^{13}C in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. **Nature**, New York, v. 329, p. 708-710, 1987.

BIONDI, L.; D'URSO, M. G.; VASTA, V.; LUCIANO, G.; SCERRA, M.; PRIOLO, A.; ZILLER, L.; BONTEMPO, L.; CAPARRA, P.; CAMIN, F. Stable isotope ratios of blood and muscle to trace dietary changes in lambs. **Animal**, Cambirdge, v. 7, p. 1559-1566, 2013.

BONER, M.; FÖRSTEL H. Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, New York, v. 378, p. 301-310, 2004.

BONTEMPO, L.; LARCHER, R.; CAMIN, F.; HÖLZL, S.; ROSSMANN, A.; HORN, P.; NICOLINI, G. Elemental and isotopic characterization of typical Italian alpine cheeses. **International Dairy Journal**, Philadelphia, v. 21, p. 441-446, 2011.

BOSTRÖM, B.; COMSTEDT, D.; EKBLAD, A. Can isotopic fractionation during respiration explain the ^{13}C -enriched sporocarps of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi? **New Phytologist**, New Jersey, v. 177, p. 1012-1019, 2008.

CAMIN, F.; MOSCHELLA, A.; MISELLI, F.; PARISI, B.; VERSINI, G.; RANALLI, P.; BAGNARESI, P. Evaluation of markers for the traceability of potato tubers grown in an organic versus conventional regime. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New Jersey, v. 87, p. 1330-1336, 2007.

CAMIN, F.; PERINI, M.; BONTEMPO, L.; FABRONI, S.; FAEDI, W.; MAGNANI, S.; BARUZZI, G.; BONOLI, M.; TABILIO, M. R.; MUSMECI, S.; ROSSMAN, A.; KELLY, S. D.; RAPISARDA, P. Potential isotopic and chemical markers for characterizing organic fruits. **Food Chemistry**, Philadelphia v. 125, p. 1072-1082, 2011.

CAMIN, F.; WEHRENS, R.; BERTOLDI, D.; BONTEMPO, L.; ZILLER, L.; PERINI, M.; NICOLINI, G.; NOCETTI, M.; LARCHER, R. H. C. N and S stable isotopes and mineral profiles to objectively guarantee the authenticity of grated hard cheeses. **Analytica Chimica Acta**, Philadelphia, v. 711, p. 54-59, 2012.

CAMIN, F.; WIETZERBIN, K.; CORTES, A. B.; HABERHAUER, G.; LEES, M.; VERSIN, G. Application of multielement stable isotope ratio analysis to the characterization of French, Italian, and Spanish cheeses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 6592-6601, 2004.

CAMPOS, D. V. B. de. **Uso da técnica de ^{13}C e fracionamento físico da matéria orgânica em solos sob cobertura de pastagens e cana de açúcar na região da Mata Atlântica**. 2003. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, UFRuralRJ, Seropédica, RJ.

CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; TRINCA, L.; SILVA, E. T. Traceability of bovine meat and bone meal in poultry by stable isotope analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, v. 8, p. 63-68, 2006.

CELANO, G.; ALLUVIONE, F.; MOHAMED, M. A. A. A.; SPACCINI, R. The stable isotope approach to study C and N sequestration processes in a soil-plant system. In: PICOLO, A. (Ed.) **Carbon Sequestration in Agricultural Soils**. Berlin: Springer, 2012. p. 107-144.

CERLING, T. E.; HARRIS, J. M.; MacFADDEN, B. J.; LEAKY, M. G.; QUADE, J.; EISENMANN, V.; EHLERINGER, J. R. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. **Nature**, New York, v. 389, p. 153-158, 1997.

CHALK, P. M.; CRASWELL, E. T.; POLIDORO, J. C.; CHEN, D. Fate and efficiency of ^{15}N -labelled slow- and controlled-release fertilizers. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, New York, v. 102, p. 167-178, 2015b.

CHALK, P. M.; INÁCIO, C. T.; A. M. T. From fertilizer to food: tracing nitrogen dynamics in conventional and organic farming systems using ^{15}N natural abundance. In: HENG, L. K.; SAKADEVAN, K.; DERCON, G.; NGUYEN, M. L. (Ed.). **Proceedings – International Symposium on Managing Soils for Food Security and Climate Change Adaptation and Mitigation**. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 2014. p. 339-349.

CHALK, P. M.; INÁCIO, C.T.; BALIEIRO, F. C.; ROWS, J. R. C. Do techniques based on ^{15}N enrichment and ^{15}N natural abundance give consistent estimates of the symbiotic dependence of N_2 -fixing plants? **Plant Soil**, New York, v. 399, p. 415-426, 2016.

CHALK, P. M.; INÁCIO, C.T.; CRASWELL, E. T.; CHEN, D. On the usage of absolute (x) and relative (δ) values of ^{15}N abundance. **Soil Biology and Biochemistry**, Philadelphia, v. 85, p. 51-53, 2015c.

CHALK, P. M.; INÁCIO, C.T.; URQUIAGA, S.; CHEN, D. ^{13}C isotopic fractionation during biodegradation of agricultural wastes. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, United Kingdom, v. 51, p. 201-213, 2015a.

CHALK, P. M.; LADHA, J. K. Estimation of legume symbiotic dependence: an evaluation of techniques based on ^{15}N dilution. **Soil Biology and Biochemistry**, Philadelphia, v. 31, p. 1901-1917, 1999.

CHALK, P. M.; MAGALHÃES, A. M. T.; INÁCIO, C. T. Towards an understanding of the dynamics of compost N in the soil-plant-atmosphere system using ^{15}N tracer. **Plant Soil**, New York, v. 362, p. 373-388, 2013.

CHALK, P. M.; SMITH, C. J.; HOPMANS, P.; HAMILTON, S. D. A yield-independent, ^{15}N -isotope dilution method to estimate legume symbiotic dependence without a non-fixing reference plant. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 23, p. 196-199, 1996.

CHALK, P. M.; INÁCIO, C. T.; CHEN, D. Tracing S dynamics in agro-ecosystems using ^{34}S . **Soil Biology & Biochemistry**. Philadelphia, v. 114, p. 295-308, 2017.

CHENG, L.; KIM, E. J.; MERRY, R. J.; DEWHURST, R. J. Nitrogen partitioning and isotopic fractionation in dairy cows consuming diets based on a range of contrasting forages. **Journal of Dairy Science**, Philadelphia, v. 94, p. 2031-2041, 2011.

CHESSON, L. A.; VALENZUELA, L. O.; O'GRADY, S. P.; CERLING, T. E.; EHLERINGER, J. R. Hydrogen and oxygen stable isotope ratios of milk in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 2358-2363, 2010.

COLETTA, L. D.; PEREIRA, A. L.; COELHO, A. A. D.; SAVINO, V. J. M.; MENTEN, J. F. M.; CORRER, E.; FRANÇA, L. C.; MARTINELLI, L. A. Barn vs. free-range chickens: Differences in their diets determined by stable isotopes. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 131, p. 155-160, 2012.

COLLISTER, J. W.; RIELEY, G.; STERN, B.; EGLINTON, G.; FRY, B. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with different carbon dioxide metabolisms. **Organic Geochemistry**, Philadelphia, v. 21, p. 619-627, 1994.

COPLEN, T. B.; BÖHLKE, J. K.; BIÈVRE, P. de; DING, T.; HOLDEN, N. E.; HOPPLE, J. A.; KROUSE, H. R.; LAMBERTY, A.; PEISER, H. S.; RÉVÉSZ, K.; REIDER, S. E.; ROSMAN, K. J. R.; ROTH, E.; TAYLOR, P. D. P.; VOCKE JUNIOR, R. D.; XIAOY, K. Isotope-abundance variation of selected elements. **Pure Applied Chemistry**, North Carolina, v. 74, p. 1987-2017, 2002.

COPLEN, T. B. Guidelines and recommended terms for expression of stable isotope-ratio and gas-ratio measurement results. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, New Jersey, v. 25, p. 2538-2560, 2011.

CRITTENDEN, R. G.; ANDREW, A. S.; LEFOURNOUR, M.; YOUNG, M. D.; MIDDLETON, H.; STOCKMANN, R. Determining the geographic origin of milk in Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis. **International Dairy Journal**, Philadelphia, v. 17, p. 421-428, 2007.

DANSGAARD, W. Stable isotopes in precipitation. **Tellus**, New Jersey, v. 16, p. 436-468, 1964.

DAWSON, T. E.; MAMBELLI, S.; PLAMBOECK, A. H.; TEMPLER, P. H.; TU, K. P. Stable isotopes in plant ecology. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 33, p. 507-559, 2002.

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; PEZZATO, A. C.; MÓRI, C.; GOTTMANN, R.; MITUO, M. A. O.; BORDINHON, A. M. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, v. 10, p. 189-194, 2008.

DENIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. **Science**, New York, v. 197, p. 261-263, 1977.

DITTER, K.; GOERGES, T.; SATTELMACHER, B. Nitrogen turnover in soil after application of animal manure and slurry as studied by the stable isotope ^{15}N : a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 161, p. 453-463, 1998.

DOUGHTON, J. A.; VALLIS, I.; SAFFIGNA, P. G. An indirect method for estimating ^{15}N isotope fractionation during nitrogen fixation by legume under field conditions. **Plant Soil**, New York, v. 144, p. 23-29, 1992.

FERNANDEZ, I.; CADISCH, G. Discrimination against ^{13}C during degradation of simple and complex substrates by two white rot fungi. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, New Jersey, v. 17, p. 2614-2620, 2003.

GARZA, H. M. Q.; DELGADO, J. A.; WONG, J. A.; LINDEMANN, W. C. ^{15}N uptake from manure and fertilizer sources by three consecutive crops under controlled conditions. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, p. 1249-1258, 2009.

GAT, J. R. Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrological cycle. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, Palo Alto, v. 24, p. 225-262, 1996.

GEORGI, M.; VOERKELIUS, S.; ROSSMANN, A.; GRAßMANN, J.; SCHNITZLER, W. H. Multielement isotope ratios of vegetables from integrated and organic production. **Plant Soil**, New York, v. 275, p. 93-100, 2005.

GILBERT, A.; ROBINS, R. J.; REMAUD, G. S.; TCHERKEZ, G. G. B. Intramolecular ^{13}C pattern in hexoses from autotrophic and heterotrophic C3 plant tissues. **Proceedings of National Academy of Science USA**. Washington, v. 109, p. 18204-18209, 2012.

GILBERT, A.; SILVESTRE, V.; ROBINS, R. J.; TCHERKEZ, G.; REMAUD, G. S. A ^{13}C NMR spectrometric method for the determination of intramolecular $\delta^{13}\text{C}$ values in fructose from plant sucrose samples. **New Phytologist**, New Jersey, v. 191, p. 579-588, 2011a.

GILBERT, A.; SILVESTRE, V.; SEGEBARTH, N.; TCHERKEZ, G.; GUILLOU, C.; ROBINS, R. J.; AKOKA, S.; REMAUD, G. S. The intramolecular ^{13}C -distribution in ethanol reveals the influence of the CO_2 -fixation pathway and environmental conditions on the site-specific ^{13}C variation in glucose. **Plant Cell and Environment**, New Jersey, v. 34, p. 1104-1112, 2011b.

GLEIXNER, G.; DANIER, H.-J.; WERNER, R. L.; SCHMIDT, H.-L. Correlations between the ^{13}C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 102, p. 1287-1290, 1993.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; GONZÁLEZ PÉREZ, C.; HERNÁNDEZ MÉNDEZ, J.; SÁNCHEZ GONZÁLEZ, C. Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and retens in hepatic tissue. **Meat Science**, Philadelphia, v. 58, p. 25-30, 2001.

HAUCK, R. D.; BREMNER, J. M. Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. **Advances in Agronomy**, Philadelphia, v. 28, p. 219-266, 1976.

HEATON, K.; KELLY, S. D.; HOOGEWERFF, J.; WOOLFE, M. Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 107, p. 506-515, 2008.

HOBBIE, E. A.; WERNER, R. A. Tansley review. Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C3 and C4 plants: a review and synthesis. **New Phytologist**, New Jersey, v. 171, p. 371-385, 2004.

HOBBIE, E. A.; SÁNCHEZ, F. S.; RYGIEWICZ, P. T. Controls of isotopic patterns in saprotrophic and ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Philadelphia, v. 48, p. 60-68, 2012.

HÖGBERG, P. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. Tansley Review No. 95, **New Phytologist**, New Jersey, v. 137, p. 179-203, 1997.

HÖGBERG, P.; PLAMBOECK, A. H.; TAYLOR, A. F. S.; FRANSON, P. M. A. Natural ^{13}C abundance reveals tropic status of fungi and host-origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forests. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 9, n. 6 p. 8534-8539, 1999.

HRISTOV, A. N.; ZAMAN, S.; VANDER POL, M.; NDEGWA, P.; CAMPBELL, L.; SILVA, S. Nitrogen losses from dairy manure estimated through nitrogen mass balance and chemical markers. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 38, p. 2438-2448, 2009.

HULTINE, K. R.; BURTCH, K. G.; EHLERINGER, J. R.; Gender specific patterns of carbon uptake and water use in a dominant riparian tree species exposed to a warming climate. **Global Change Biology**, New Jersey, v. 19, p. 3390-3405, 2013.

HUSS-DANEL, K.; CHAIA, E. Use of different plant parts to study N_2 fixation with ^{15}N techniques in field-grown red clover (*Trifolium retense*). **Physiologia Plantarum**, New Jersey, v. 125, p. 21-31, 2005.

INÁCIO, C. T.; CHALK, P. M.; MAGALHÃES, A. M. T. Principles and limitations of stable isotopes in differentiating organic and conventional foodstuffs: 1. Plant products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Abingdon, v. 55, p. 1206-1218, 2015.

INÁCIO, C. T.; CHALK, P. M.; Principles and limitations of stable isotopes in differentiating organic and conventional foodstuffs: 2. Animal products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Abingdon, v. 57, p. 181-196, 2017.

INÁCIO, C. T.; CHALK, P. M.; URQUIAGA, S. Compos-N recovery: ^{15}N natural abundance quantitative approach. In: INTERNATIONAL NITROGEN INNITATIVE CONFERENCE, 7., 2016, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: Melbourne University, 2016.

INÁCIO, C. T.; MAGALHÃES, A. M. T.; SOUZA, P. O.; CHALK, P. M.; URQUIAGA, S. The relative isotopic abundance ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) during composting of agricultural wastes in relation to compost quality and feedstock. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, 2017. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10256016.2017.1377196?needAccess=true>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

INÁCIO, C. T.; URQUIAGA, S.; CHALK, P. M.; MATA, M. G. F.; SOUZA, P. O. Identifying N fertilizer regime and vegetable production system in tropical Brazil using ^{15}N natural abundance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New Jersey, v. 95, p. 3025-3032, 2015a.

INÁCIO, C. de T. Uso da Abundância Natural de ^{15}N em Estudos com Fertilizantes Orgânicos. 2015. 118f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

JUNK, G.; SVEC, H. J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Philadelphia, v. 14, p. 234-243, 1958.

KELLY, S. D.; SCOTTER, M. J.; MACARTHUR, R.; CASTLE, L.; DENNIS, M. J. Survey of stable sulfur isotope ratios ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) of sulfite and sulfate in foods. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 19, p. 1003-1009, 2002.

KIM, Y.-J.; CHOI, W.-J.; LIM, S.-S.; KWAK, J.-H.; CHANG, S. X.; KIM, H.-Y.; YOON, K.-S.; RO, H.-M. Changes in nitrogen isotopic compositions during composting of cattle feedlot manure: effects of bedding material type. **Bioresource Technology**, Philadelphia, v. 99, p. 5452-5458, 2008.

KOHN, M. J. Predicting animal $\delta^{18}\text{O}$: Accounting for diet and physiological adaptation. **Geochemical et Cosmochimica Acta**, Philadelphia, v. 60, p. 4811-4829, 1996.

KOHZU, A.; YOSHIOKA, T.; ANDO, T.; TAKAHASHI, M.; KOBAYASHI, K.; WADA, E. Natural ^{15}N and ^{13}C abundance of field-collected fungi and their ecological implications. **New Phytologist**, New Jersey, v. 144, p. 323-330, 1999.

LARCHER, W. **Physiological Plant Ecology**. 4th ed. Springer, Berlin. 2003. p. 513.

LIM, S.-S.; LEE, S.-M.; LEE, S.-H.; CHOI, W.-J. Nitrogen isotope compositions of synthetic fertilizer, raw livestock manure slurry, and composted livestock manure. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, Korea, v. 43, p. 453-457, 2010.

LUYKX, D. M. A. M.; VAN RUTH, S. M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 107, p. 897-911, 2008.

LYNCH, D. H.; VORONEY, R. P.; WARMAN, P. R. Use of ^{13}C and ^{15}N natural abundance techniques to characterize carbon and nitrogen dynamics in composting and in compost-amended soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Philadelphia, v. 38, p. 103-114, 2006.

MAEDA, K.; TOYODA, S.; SHIMOJIMA, R.; OSADA, T.; HANAJIMA, D.; MORIOKA, R.; YOSHIDA, N. Source of nitrous oxide emissions during the cow manure composting process as revealed by isotopomer analysis of and amoA abundance in betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 76, p. 1555-1562, 2010.

MANCA, G.; FRANCO, M. A.; VERSINI, G., CAMIN, F., ROSSMANN, A., TOLA, A. Correlation between multielement stable isotope ratio and geographical origin in Peretta cows' milk cheese. **Journal of Dairy Science**, Philadelphia, v. 89, p. 831-839, 2006.

MIZOTA, C.; SASAKI, A. Sulfur isotope composition of soils and fertilizers: differences between northern and southern hemispheres. **Geoderma**, Philadelphia, v. 71, p. 77-93, 1996.

MOLKENTIN, J. Applicability of organic milk indicators to the authentication of processed products. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 137, p. 25-30, 2013.

MOLKENTIN, J.; GIESEMANN, A. Differentiation of organically and conventionally produced milk by stable isotope and fatty acid analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, New York, v. 88, p. 297-305, 2007.

MOLKENTIN, J.; GIESEMANN, A. Follow-up of stable isotope analysis of organic versus conventional milk. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, New York, v. 398, p. 1493-1500, 2010.

MUÑOZ, G. R.; POWELL, J. M.; KELLING, K. A. Nitrogen budget and soil N dynamics after multiple applications of unlabeled or ¹⁵N-enriched dairy manure. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 67, p. 817-825, 2003.

NAKASHITA, R.; SUZUKI, Y.; AKAMATSU, F.; IIZUMI, Y.; KORENAGA, T.; CHIKARAISHI, Y. Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. **Analytica Chimica Acta**, Philadelphia, v. 617, p. 148-152, 2008.

NOVÁK, M.; BUZEK, F.; HARRISON, A. F.; PŘECHOVÁ, E.; JAČKOVÁ, I.; FOTTOVÁ, D. Similarity between C, N and S stable isotope profiles in European spruce forest soils: implications for the use of $\delta^{34}\text{S}$ as a tracer. **Applied Geochemistry**, Philadelphia, v. 18, p. 765-779, 2003.

OBERSON, A.; NANZER, S.; BOSSHARD, C.; DUBOIS, D.; MÄDER, P.; FROSSARD, E. Symbiotic N_2 fixation by soybean in organic and conventional cropping systems estimated by ¹⁵N dilution and ¹⁵N natural abundance. **Plant Soil**, New York, v. 290, p. 69-83, 2007.

OLESEN, J. E.; SORENSEN, P.; THOMSEN, I. K.; ERIKSEN, J.; THONSEN, A. G.; BERNSTEN, J. Integrated nitrogen input systems in Denmark. In: MOSIER, A.; SYERS, J. K.; FRENEY, J. R. (Ed.). **Agriculture and the Nitrogen Cycle**. 2nd ed. Washington: Island Press, 2004. p. 129-140. (Committee on Problems of Environment, Scope, 65).

OSORIO, M. T.; MOLONEY, A. P.; SCHMIDT, O.; MONAHAN, F. J. Beef authentication and retrospective dietary verification using stable isotope ratio analysis of bovine muscle and tail hair. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 3295-3305, 2011.

PECK, W. H.; TUBMAN, S. C. Changing carbon isotope ratio of atmospheric carbon dioxide: Implications for food authentications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 2364-2367, 2010.

PESSENDA, L.C.R., BOULET, R., ARAVENA, R., ROSOLEN, V., GOUVEIA, S.E.M., RIBEIRO, A.S., LAMOTTE, M. Origin and dynamics of soil organic matter and vegetation changes during the Holocene in a forest savanna transition zone, Brazilian Amazon region. **Holocene**, Wales, v. 11, p. 250-254, 2001.

PILLONEL, L.; BADERTSCHER, R.; CASEY, M.; MEYER, J.; ROSSMANN, A.; SCHLICHTERLE-CERNY, H.; TABACCHI, R.; BOSSET, J. O. Geographic origin of European Emmental cheese: Characterisation and descriptive statistics. **International Dairy Journal**, Philadelphia, v. 15, p. 547-556, 2005.

POWELL, J. M.; KELLING, K. A.; MUÑOZ, G. R.; CUSICK, P. R. Evaluation of dairy manure nitrogen-15 enrichment methods on short-term crop and soil nitrogen budgets. **Agronomy Journal**, Washington, v. 97, p. 333-337, 2005.

RAPISARDA, P.; CAMIN, F.; FABRONI, S.; PERINI, M.; TORRISI, B.; INTRIGLILOLO, F. Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{34}\text{S}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 3502-3506, 2010.

RENOU, J-P.; DEPONGE, C.; GACHON, P.; BONNEFOY, J-C.; COULON J-B.; GAREL, J-P.; AND RITZ, P. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 85, p. 63-66, 2004.

ROBINSON, D. $\delta^{15}\text{N}$ as an integrator of the nitrogen cycle. **Trends in Ecology and Evolution**, Philadelphia, v. 16, p. 153-162, 2001.

ROGERS, K. M. Nitrogen isotopes as a screening tool to determine the growing regimen of some organic and nonorganic supermarket produce from New Zealand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 4078-4083, 2008.

ROSSMANN, A.; BUTZENLECHNER, M.; SCHMIDT, H-L. Evidence for nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 609-614, 1991.

ROSSMANN, A.; HABERHAUER, G.; HÖLZL, S.; HORN, P.; PICHLMAYER, F.; VOERKELIUS, S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. **European Food Research and Technology**, New York, v. 211, p. 32-40. 2000.

RUMMEL, S.; HOELZL, S.; HORN, P.; ROSSMANN, A.; SCHLICHT, C. The combination of stable isotope abundance ratios of H, C, N and S with $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ for geographical origin assignment of orange juices. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 118, p. 890-900, 2010.

SCHELLENBERG, A.; CHMIELUS, S.; SCHLICHT, C.; CAMIN, F.; PERINI, M.; BONTEMPO, L.; HEINRICH, K.; KELLY, S. D.; ROSSMANN, A.; THOMAS, F.; JAMIN, E.; HORACEK, M. Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. **Food Chemistry**, Philadelphia v. 121, p. 770-777. 2010.

SCHMIDT, H-L.; ROßMANN, A.; VOERKELIUS, S.; SCHNITZLER, W. H.; GEORGI, M.; GRAßMANN, J.; ZIMMERMANN, G.; WINKLER, R. Isotope characteristics of vegetables and wheat from conventional and organic production. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, Abingdon, v. 41, 223–228, 2005.

SCHWERTL, M.; AUERSWALD, K.; SCHÄUFELE, R.; SCHNYDER, H. Carbon and nitrogen stable isotope composition of cattle hair: ecological fingerprints of production systems? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Philadelphia, v. 109, p. 153-165, 2005.

SENBAYRAM, M.; DIXON, L.; GOULDING, K. W. T.; BOL, R. Long-term influence of manure and mineral nitrogen applications on plant and soil ^{15}N and ^{13}C values from the Broadbalk Wheat Experiment. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, New Jersey, v. 22, p. 1735–1740, 2008.

SERRET, M. D.; ORTIZ-MONASTERIO, I.; PARDO, A.; ARAUS, J. L. The effect of urea fertilization and genotype on yield, nitrogen use efficiency, $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in wheat. **Annals of Applied Biology**, New Jersey, v. 156, p. 243-257, 2008.

SISTI, C. P. J.; SANTOS, H. P.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Philadelphia, v. 76, p. 39-58, 2004.

TANZ, N.; SCHMIDT, H-L. $\delta^{34}\text{S}$ -value measurements in food origin assignment and sulphur isotope fractionations in plants and animals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 3139-3146. 2010.

TAYLOR, A. F. S.; FRANSSON, P. M.; HÖGBERG, P.; HÖGBERG, M. N.; PLAMBOECK, A. H. Species level patterns in ^{13}C and ^{15}N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. **New Phytologist**, New Jersey, v. 159, p. 757-774, 2003.

THÖNNISEEN, C.; MIDMORE, D. J.; LADHA, J. K.; OLK, D. C.; SCHMIDHALTER, U. Legume decomposition and nitrogen release when applied as green manures to tropical vegetable production systems. **Agronomy Journal**, Washington, v. 92, p. 253-260, 2000.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring Plant-Associated Nitrogen Fixation in Agricultural Systems**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2008. 258 p.

URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; CAMPOS, D. de V.; BODDEY, R. M. Aplicação de Técnicas de ^{13}C em Estudos de Sequestro de C em Solos Agrícolas. In: ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; AITA, C.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Manejo de Sistemas Agrícolas: impacto no sequestro de C e nas emissões de Gases de efeito estufa**. Porto Alegre, RS: Genesis, 2006. p. 13–33.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **USDA organic regulations. 7 CFR Part 205**. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/rules-regulations/organic>>. Acesso em: 27 de jan. 2016.

VITORELLO, V. A.; CERRI, C.; ANDREUX, F.; FELLER, C.; VICTÓRIA, R. L. Organic matter and natural carbon-13 distribution in forested and cultivated oxisols. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.53, p. 773-778, 1989.

VITÓRIA, L.; OTERO, N.; SOLER, A.; CANALS, À. Fertilizer characterization: Isotopic data (N, S, O, C and Sr). **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 38, p. 3254-3262, 2004.

WANEK, W.; ARNDT, S. K. Difference in $\delta^{15}\text{N}$ signatures between nodulated roots and shoots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic N_2 fixation to plant N. **Journal of Experimental Botany**, Philadelphia, v. 371, p. 1109–1118, 2002.

YUN, S-I.; RO, H-M. Stable C and N isotopes: A tool to interpret interacting environmental stress on soil and plant. **Journal of Applied Biological Chemistry**, New York, v. 56, p. 262-271, 2008.

YUN, S-I.; RO, H-M.; Natural ^{15}N abundance of plant and soil inorganic-N as evidence for over-fertilization with compost. **Soil Biology Biochemistry**, v. 41, p. 1541-1547, 2009.

ZZAZZO, A.; MONAHAN, F. J.; MOLONEY, A. P.; GREEN, S.; SCHMIDT, O. Sulphur isotopes in animal hair track distance to sea. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, New Jersey, v. 25, p. 2371-2378, 2011.

Embrapa

Solos