

Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas

STABLE ISOTOPES IN ECOLOGICAL STUDIES: METHODS, APPLICATIONS AND PERSPECTIVES

Alexandre Leandro Pereira
Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)
Evanilde Benedito
Universidade Estadual de Maringá

RESUMO

Isótopos estáveis de carbono, nitrogênio, enxofre, hidrogênio e oxigênio são considerados, atualmente, ferramentas úteis aos fisiologistas, ecólogos e a outros pesquisadores que estudam os ciclos de matéria e energia no ambiente. Nos últimos vinte anos, essa técnica vem sendo aplicada em ambientes aquáticos e tem se mostrado muito eficiente e promissora. Os isótopos estáveis de H e O são utilizados na determinação da composição da água utilizada pelos vegetais, já os isótopos de C, N e S são utilizados para elucidar vias fotossintéticas, processos fisiológicos nos vegetais ou na determinação das fontes de alimento para consumidores em teias alimentares aquáticas ou terrestres. Os isótopos estáveis estão presentes nos ecossistemas e sua distribuição natural reflete, de forma integrada, a história dos processos físicos e metabólicos do ambiente. Desse modo, este trabalho objetiva apresentar, numa visão crítica, a base teórica para o entendimento dos mecanismos que envolvem a utilização dos isótopos estáveis em estudos ecológicos, com ênfase nos ambientes de águas interiores.

PALAVRAS-CHAVE

Isótopos estáveis. Teia alimentar. Ambientes Aquáticos.

INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, constata-se um crescente uso de isótopos estáveis nos mais diferentes campos da ciência. Os primeiros estudos envolvendo a aplicação dos isótopos estáveis foram realizados no início da década de 50 por geoquímicos e paleo-ocenoógrafos que desenvolveram uma rigorosa base teórica e empírica para a integração dos isótopos aos estudos dos ciclos globais dos elementos, analisando, inicialmente, as condições climáticas do passado, os

sistemas de expansão hidrotérmicos e a origem das formações rochosas (LAJTHA; MICHENER, 1994).

Porém, apenas recentemente, nos anos 80, os ecólogos têm aplicado essa técnica. As razões para isso podem ser atribuídas não apenas a falta de conhecimento em química e geoquímica, o que permitiria compreender as variações naturais na composição dos isótopos estáveis em organismos animais e vegetais, como também, ao fato de que as determinações das razões isotópicas requerem equipamentos, normalmente, não disponíveis aos ecólogos (PETERSON; FRY, 1987).

Os elementos C, N, S, H e O possuem mais que um isótopo, e a composição isotópica natural dos materiais pode ser medida, com elevada precisão, utilizando espectrômetro de massa (PETERSON; FRY, 1987; DAWSON; BROOKS, 2001). Assim, avanços nessa tecnologia têm aberto novas possibilidades para análises de materiais biológicos em estudos ambientais. A nova instrumentação tem, também, facilitado as interpretações ecológicas resultando, muitas vezes, numa considerável economia de esforços e recursos financeiros exigidos anteriormente nas atividades de campo (UNKOVICH et al., 2001).

As análises isotópicas são consideradas, atualmente, como uma importante ferramenta para fisiologistas, ecólogos e outros pesquisadores que estudam os ciclos dos elementos e matéria no ambiente. Além disso, a abundância natural isotópica pode ser usada: para traçar padrões e verificar mecanismos fisiológicos em organismos; traçar fluxos energéticos em cadeias alimentares; no entendimento de paleo-dietas; e ainda no estabelecimento das vias de ciclagem de nutrientes em ecossistemas terrestres e aquáticos (LAJTHA; MICHENER, 1994).

Sendo assim, este trabalho objetiva apresentar a base teórica para o entendimento dos mecanismos que envolvem a utilização dos isótopos estáveis em estudos ecológicos, com ênfase nos ecossistemas de águas interiores.

Definições, terminologias e medidas

A palavra "isótopo" vem do grego, isos (igual) e topos (lugar), a qual se refere a um local comum de um elemento específico na tabela periódica. Considerando que um átomo é composto de um núcleo cercado por elétrons, sendo o núcleo composto de prótons (Z) e nêutrons (N) que constituem a massa do átomo. A massa atômica de um elemento atômico, por sua vez, é a soma de Z + N no núcleo. Um núcleo, ou átomo específico-isótopo, é uma "espécie" de um elemento que pode ser estável ou radioativo, definido pelo seu único número de prótons (Z) e nêutrons (N) (DAWSON; BROOKS, 2001).

Enquanto os prótons são positivamente carregados (Z+), os elétrons são negativamente carregados (e-) e os nêutrons não possuem carga (N). Assim, isótopos são átomos de um mesmo elemento que possuem o mesmo Z e mesmo e, mas diferente N. Por exemplo, todos os isótopos de carbono têm seis prótons, mas o isótopo radioativo ^{14}C tem dois nêutrons a mais (N = 8) que o seu isótopo estável e mais comum ^{12}C (N = 6). Um isótopo é considerado estável quando a razão Z/N $\cong 1 - 1,5$. Os isótopos estáveis de muitos elementos são formados por isótopos abundantes e um ou dois isótopos relativamente menos abundantes (Tabela I). Estes isótopos de baixa abundância promovem oportunidades de usar fontes enriquecidas de isótopos como traçadores em estudos bioquímicos, biológicos e ambientais (DAWSON; BROOKS, 2001).

Muitos estudos ecológicos expressam a composição isotópica em termos de δ , que representam partes por mil (‰) de diferença do isótopo da amostra em relação ao padrão:

$$\delta X = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3,$$

onde X é ^{13}C , ^{15}N ou ^{34}S , e R é a razão correspondente $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ou $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$. Assim, os valores δ correspondem à razão entre isótopos pesados e leves na amostra, por exemplo, ^{13}C e ^{12}C , respectivamente. Aumentos nesses valores denotam incremento do montante de isótopos pesados (PETERSON; FRY, 1987).

Um valor positivo de δ indica que a amostra tem razão isotópica maior que o padrão e que possui mais espécies isotópicas pesadas comparadas a este. Por outro lado, os valores negativos indicam que a amostra tem uma razão isotópica menor que aquela do padrão. Considerando, por exemplo, uma amostra desconhecida com um valor de $\delta^2\text{H}$ de -50‰, significa que ela tem razão isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$, 50 partes por mil (‰) ou 5% menor que a razão $^2\text{H}/^1\text{H}$ padrão da água. É comum utilizar-se dos termos "muito/pouco", "mais/menos", "enriquecido/empobrecido" ou "positivo/negativo" quando se refere aos valores de δ (DAWSON; BROOKS, 2001).

Padrões utilizados

O valor de δ de todas as referências do padrão é por definição 0‰ (Figura 1). Esses padrões podem ser obtidos na International Atomic Energy Agency (IAEA) em Viena, Áustria e no National Institute of Standards and Technology (NIST) nos Estados Unidos.

Os valores das amostras biológicas são expressos contra esses padrões quando as razões isotópicas são determinadas usando-se um espectrômetro de massa. Porém, esses padrões são muitas vezes de alto custo para o uso nas análises diárias, assim muitos laboratórios utilizam seu "padrão interno de trabalho" (UNKOVICH et al., 2001).

Exemplos de padrões utilizados internacionalmente na comparação com amostras biológicas de isótopos encontrados na Biosfera são mostrados na Tabela I.

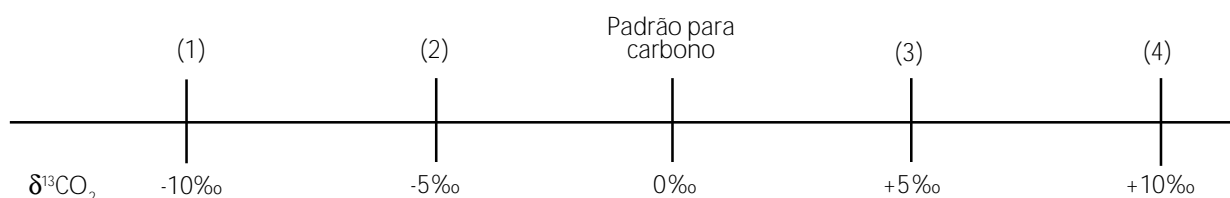


Figura 1- Exemplo de valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ para quatro amostras comparadas a um padrão. As amostras (1) e (2) apresentam menor concentração de $^{13}\text{CO}_2$, enquanto que as amostras (3) e (4) possuem maior concentração de $^{13}\text{CO}_2$ (Fonte: DUCATTI, 2005).

Tabela I- Abundância, razão isotópica e padrão aceito internacionalmente para os principais isótopos usados em estudos ecológicos (modificado de DAWSON; BROOKS, 2001).

Elemento	Isótopo	Abundância (%)	Razão	Padrão
Hidrogênio	¹ H	99,985	² H/ ¹ H	SMOW ^a
	² H (D)	0,015		
Carbono	¹² C	98,98	¹³ C/ ¹² C	PDB ^b
	¹³ C	1,11		
Nitrogênio	¹⁴ N	99,63	¹⁵ N/ ¹⁴ N	N ₂ -atm ^c .
	¹⁵ N	0,37		
Oxigênio	¹⁶ O	99,759	¹⁸ O/ ¹⁶ O	SMOW, PDB
	¹⁷ O	0,037		
Enxofre	³² S	95,00	³⁴ S/ ³² S	CDT ^d
	³⁴ S	4,22		

^a O padrão para o hidrogênio com massa dois (²H), conhecido como deuterium, (D) é a "Standard Mean Ocean Water" (SMOW); ^b para o carbono o padrão é a rocha do fóssil Belemnite americana da formação PeeDee (PDB) da Carolina do Sul, EUA; ^c o nitrogênio tem como padrão gás N₂ atmosférico; ^d para o enxofre é mineral Troilito da cratera do meteorito do "Canyon Diablo" (CDT), Arizona, EUA.

Espectrômetro de massa

Para a determinação da razão isotópica é necessária a utilização de um espectrômetro de massa ou "Isotope Ratio Mass Spectrometers" (IRMS). No IRMS, as amostras são submetidas à alta temperatura em tubo de combustão, e em presença de oxigênio (O₂) e óxido de cobre (CuO) são transformadas em compostos de carbono e nitrogênio, como o CO₂ e NO_x, e este último reduzido a N₂ na presença de cobre. Os materiais contendo enxofre são convertidos em sulfatos e, transformados quantitativamente em SO₂. Esses gases puros são então separados em uma coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massa e a composição isotópica da amostra é comparada com um padrão conhecido (PETERSON; FRY, 1987).

Fracionamento isotópico

A utilização das razões isotópicas em estudos ambientais baseia-se na existência de diferenças na composição isotópica dos compostos que participam do processo em estudo, sensíveis o suficiente para serem detectados pelo espectrômetro de massa. Tais diferenças ocorrem na natureza e são frutos de reações físico-químicas e/ou biológicas, possibilitando, deste modo, a discriminação de um dos isótopos (MARTINELLI et al., 1988).

Esse processo de discriminação isotópica é chamado de fracionamento isotópico, o qual pode ser resumido como um enriquecimento ou empobrecimento do isótopo pesado da amostra em estudo (produto) em relação a sua fonte (substrato) (LOPES, 2001).

Um exemplo bem conhecido é o fracionamento

isotópico do carbono na fotossíntese (MARTINELLI et al., 1992). Estudos sobre as rotas fotossintéticas mostram que as plantas terrestres C₃ têm uma média de -27,8‰, isto é, cerca de 20‰ mais negativas que sua fonte de carbono, o CO₂ atmosférico ($\delta^{13}C_{CO_2} = -7,4‰$). A composição isotópica da planta reflete a fonte (-7,4‰) e o fracionamento (-20,4‰), assim a informação obtida é $-27,8_{planta} = -7,4_{fonte} - 20,4_{fracionamento}$.

Em estudos ecológicos, o entendimento dos processos de fracionamento é imprescindível para a compreensão de como a matéria passa de um nível trófico a outro no ecossistema, pois à medida que os isótopos passam pelos compartimentos em uma cadeia alimentar, por exemplo, eles podem ter seu valor aumentado ou diminuído. Assim, o fracionamento isotópico é uma das bases teóricas na interpretação de pesquisas que utilizam isótopos estáveis.

Isótopos estáveis em ecologia

Os isótopos estáveis mais usados são: carbono, nitrogênio, enxofre, oxigênio e hidrogênio, podem ser analisados juntos ou separadamente, dependendo do objetivo do estudo.

Eles podem ser utilizados em diversos tipos de estudos ecológicos e em várias áreas da ecologia vegetal e animal, como para elucidar vias fotossintéticas e processos fisiológicos em plantas (LAJTHA; MARSHALL, 1994), em estudos que envolvem migrações de animais, na determinação das fontes de alimento para consumidores em teias alimentares aquáticas ou terrestres; na determinação de fontes de poluição e,

também, na reconstrução de dieta em estudos de paleoecologia (HOBSON; WASSENAAR, 1999).

Nesses casos, devem-se considerar os processos naturais ou antropogênicos que podem influenciar na abundância natural dos isótopos (Tabela 2) (RUBENSTEIN; HOBSON, 2004). Assim, a escolha do isótopo a ser utilizado deve condizer com o objetivo do trabalho e, principalmente, a que perguntas se pretendem responder.

Hidrogênio e oxigênio

Os principais estudos sobre vegetação que

incorporam o uso de isótopos estáveis são aqueles que visam determinar a composição da água utilizada pelas plantas. Existem muitos métodos para a quantificação do uso da água. Todavia, tem sido difícil identificar a fonte de obtenção de água pelas plantas, especialmente quando existem mais de uma origem provável (WALKER et al., 2001).

Desse modo, é relevante o conhecimento de onde as plantas retiram a água, pois o uso dela vegetação pode conflitar com a demanda de extração do lençol freático pelas indústrias ou mesmo pelas alterações antrópicas impostas sobre os cursos de água naturais (WALKER et al., 2001).

Tabela 2- Processos que influenciam a abundância isotópica em ambientes naturais e impactados (modificado de RUBENSTEIN; HOBSON, 2004).

Isótopo	Processos que influenciam na abundância isotópica	
	Biológicos e/ou biogeoquímicos	Antropogênicos
Carbono ($\delta^{13}\text{C}$)	<p>Varia nos tecidos vegetais com:-</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fracionamento isotópico durante a fotossíntese em espécies de via C_3, C_4 e CAM;- - Condições ambientais que limitam as reações enzimáticas durante a fotossíntese ou alteram a abertura estomatal. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agricultura (com plantas C_4) em ecossistemas naturais (com plantas C_3);- - Fontes de poluição aquática ou atmosférica.
Hidrogênio ($\delta^2\text{H}$) e Oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$)	<p>Varia em corpos d'água com:-</p> <ul style="list-style-type: none"> - Padrões de precipitação;- - Temperatura;- - Altitude;- - Umidade relativa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Irrigação com águas subterrâneas;- - Criação de lagos artificiais que influenciam os padrões climáticos locais;- - Mudança de clima induzida pelo homem.
Nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$)	<p>Varia nos tecidos vegetais pelo modo da fixação do N_2:-</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fixação simbiótica;- - Conversão direta do N_2 atmosférico. 	<ul style="list-style-type: none"> - Uso de fertilizantes na agricultura;- - Práticas do uso do solo que resultam na amonificação ou perda de ^{14}N.
Enxofre ($\delta^{34}\text{S}$)	<p>Varia na natureza com:-</p> <ul style="list-style-type: none"> - Distribuição dos sulfetos leves e pesados na rocha-mãe;- - Qualidade das condições para o desenvolvimento das plantas (aeróbico x anaeróbico);- - Deposição atmosférica de fontes naturais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fontes pontuais de poluição;- - Poluição do ar por combustíveis fósseis.

Para a aplicação desse método, compara-se a composição isotópica do material vegetal com as várias fontes, e então pode-se inferir de onde o vegetal obtém sua água. Assume-se que a composição da fonte não se altera ao ser extraída pela planta. Conseqüentemente, se a planta obtém toda sua água de uma única fonte, sua composição isotópica será idêntica à mesma (WALKER et al., 2001).

As possíveis fontes de água para os vegetais podem ser: a água do solo, de várias profundidades; a água do lençol freático; de rios; ou de pulsos de inundação. Estudos realizados por Thorburn e Walker apud Walker et al. (2001) reportam que alterações no regime do fluxo de água, resultante da regulação do rio, influenciam na sobrevivência de espécies de eucaliptos em uma planície de inundação. Para isso, esses pesquisadores analisaram os isótopos estáveis de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de amostras da água subterrânea, a várias distâncias do rio (entre 0,5 e 40m), de água do rio e do xilema das plantas, além de amostras do perfil do solo em diferentes profundidades. As amostras do xilema das plantas localizadas entre 15 a 40 m de distância do rio, combinaram com os valores de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ da água do solo de 0,2 m de profundidade e também abaixo de 1,4 m, incluindo o lençol freático (Figura 2). O xilema dos ramos, amostrados à margem do rio (local C), evidenciou mistura da água do rio e água do solo de 0,05 a 0,25m de profundidade, durante o verão. Nesse estudo, os autores concluíram que a tomada de água pelos eucaliptos é extremamente dependente da disponibilidade de água da superfície do solo. Em todos os casos, uma mistura da água do solo e do lençol freático foi importante, sendo uma fonte segura de água e podendo constituir-se em um suprimento de nutrientes.

A ocorrência natural dos isótopos estáveis de hidrogênio também foi usada para determinar potenciais fontes de água em diferentes estações do ano, para plantas que se desenvolvem sobre um aquífero no sudoeste da Austrália (ZENCICH et al., 2002). A razão isotópica da água do xilema das espécies de árvores dominantes (*Banksia* sp) foi comparada às suas potenciais fontes (água da precipitação, água misturada ao solo e água do lençol freático). Os autores verificaram que o uso da água pelas plantas pode variar com a estação do ano.

Assim, no verão, a variação das possíveis fontes de água foi baixa e bem definida: a água do lençol freático foi usada, predominantemente (85-99%), devido à seca

na superfície e sub-superfície do solo. Durante o inverno úmido, quando ocorreu maior precipitação, a superfície do solo contribuiu com 52-70% da água do xilema dos ramos. Entretanto, houve uma ampla variação de possíveis combinações da água do lençol freático e da sub-superfície do solo, a qual explicou o $\delta^2\text{H}$ observado na água do xilema dos ramos (Figura 3).



Figura 2- Diagrama esquemático do uso da água do rio por Eucaliptos na planície de inundação do rio Murray – Chowilla, Austrália (adaptado de WALKER; et al., 2001).

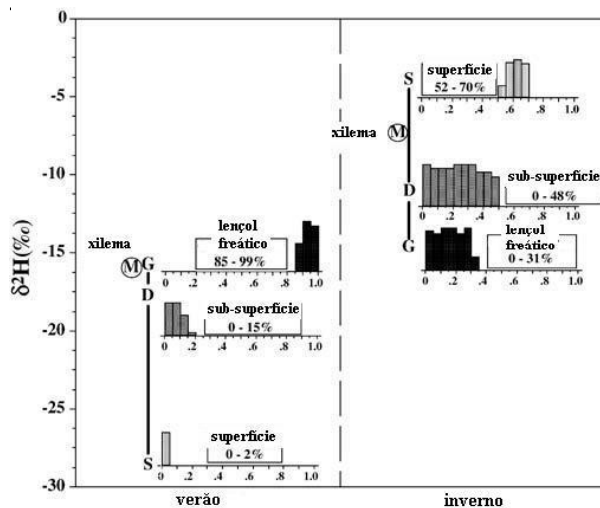


Figura 3- Valores isotópicos para água de três profundidades de solo (superfície (S), sub-superfície (D) e lençol freático (G)) e para o xilema (M) das árvores de *Banksia* sp, na Austrália durante o verão e o inverno. Os histogramas mostram a distribuição das contribuições de cada fonte na água do xilema da planta (M) (ZENCICH; et al., 2002).

Carbono, Nitrogênio e Enxofre

O ciclo do carbono envolve atividades de troca de CO_2 entre a atmosfera, ecossistemas terrestres e a superfície do oceano (Figura 4). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosférico diminuem em resposta às entradas de ^{13}C empobrecido, originário da queima de combustíveis fósseis, aliada à biomassa vegetal, queimada ou em decomposição. Em ambientes aquáticos, o valor de $\delta^{13}\text{C}$ varia amplamente dependendo da fonte de CO_2 dissolvido, podendo ter sua origem em rochas calcárias, minerais, atmosfera ou da matéria orgânica (PETERSON; FRY, 1987).

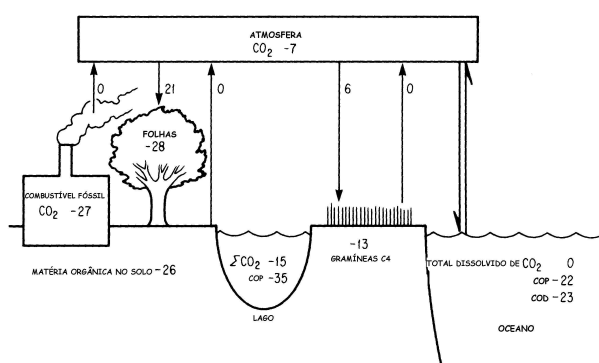


Figura 4- Distribuição do $\delta^{13}\text{C}$ no ecossistema. Flechas indicam o fluxo de CO_2 . Números nos compartimentos indicam o valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) e número nas flechas indica o fracionamento que ocorre durante a transferência. COP: carbono orgânico particulado, COD: carbono orgânico dissolvido (PETERSON; FRY, 1987).

O nitrogênio está presente, em maior parte, na biosfera na forma de gás N_2 atmosférico. Esse reservatório é bem homogeneizado, com uma composição isotópica que é, essencialmente, constante a 0‰ (Figura 5). Por outro lado, pode ser encontrado um grande contraste nos valores isotópicos em lagos em que a produção primária é limitada por N (sem fracionamento do fitoplâncton) versus P (N abundante, na qual ocorre grande fracionamento durante a tomada de N pelo fitoplâncton). Em ambientes aquáticos, em que o fitoplâncton tem valores de $\delta^{15}\text{N}$ diferentes da vegetação terrestre, os isótopos de nitrogênio podem funcionar como marcadores para matéria orgânica de origem autóctone ou alóctone (PETERSON; FRY, 1987).

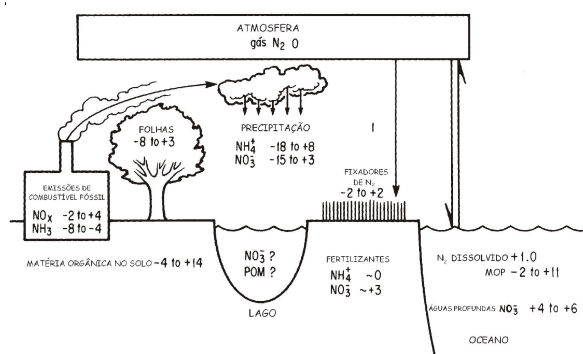


Figura 5- Distribuição do $\delta^{15}\text{N}$ nos ecossistemas. MOP: matéria orgânica particulada. Legendas na figura 6 (PETERSON; FRY, 1987).

Já o enxofre está na forma de sulfato no oceano, que é um grande reservatório, com composição isotópica de 21‰ mais pesado que o padrão do troilito do "Canyon Diablo". Em áreas industrializadas, o valor isotópico de $\delta^{34}\text{S}$ é mais positivo (PETERSON; FRY, 1987) (Figura 6).

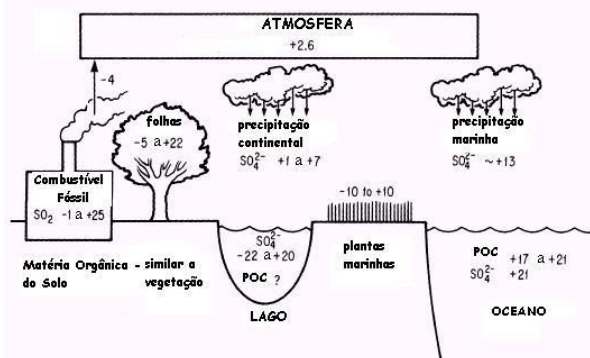


Figura 6- Distribuição do $\delta^{34}\text{S}$ nos ecossistemas. Legenda na figura 4 (PETERSON; FRY, 1987).

Esses isótopos têm sido freqüentemente empregados em trabalhos com produtores primários, e, talvez, um dos mais intensivos estudos realizados, tanto por ecólogos quanto por fisiologistas vegetais, seja aquele objetivando analisar o processo de fracionamento do carbono em vias fotossintéticas distintas (PARK; EPSTEIN, 1960; SMITH; EPSTEIN, 1971). Como resultado, é amplamente conhecido que os valores isotópicos de carbono podem ser diferenciados entre os três grupos de plantas C_3 , C_4 e MAC (Metabolismo Ácido Crassuláceo).

Nas plantas C_3 , o fracionamento do carbono ocorre nos dois passos do processo fotossintético: difusão/dissolução e carboxilação. No segundo passo desse processo, a carboxilação pela enzima ribulose-1,5 bifosfato carboxilase (RUBISCO) causa um elevado

fracionamento, pois essa enzima tem grande afinidade por $^{12}\text{CO}_2$, conseqüentemente a planta C_3 é muito empobrecida em carbono pesado ($\delta^{13}\text{C} = -34$ a -22%) (GANNES; DEL RIO; KOCK, 1998).

Já as plantas C_4 usam a via fotossintética Hatch-Slack, em que a enzima de carboxilação fosfenolpiruvato (PEP) carboxilase reduz o CO_2 a ácido aspártico ou málico, discriminando menos contra o ^{13}C . Os valores isotópicos das plantas C_4 demonstram que o seu $\delta^{13}\text{C}$ permanece aproximadamente em -14% (de -7 a -16%) (LOPES; BENEDITO-CECILIO, 2002).

As plantas que utilizam a via metabólica dos ácidos crassuláceos (MAC) possuem as mesmas enzimas utilizadas na via C_4 , porém com atividade enzimática diferenciada. Essas plantas fixam o CO_2 durante a noite, usando a PEP-carboxilase com fracionamento, comumente, encontrado em plantas C_4 , associado ao de C_3 , sendo sua variabilidade isotópica registrada entre -10 e -28% (LOPES; BENEDITO-CECILIO, 2002).

Considerando que os vegetais são os principais produtores primários no ecossistema, as informações acima são fundamentais, pois formam o alicerce para a aplicação das variações naturais de $\delta^{13}\text{C}$ em estudos ambientais, valendo-se das diferenças entre as plantas do tipo C_3 , C_4 e MAC (MARTINELLI et al., 1988).

Por outro lado, o $\delta^{15}\text{N}$ das plantas assemelha-se ao de sua fonte de nitrogênio por duas razões: primeiro, as plantas não fracionam o nitrogênio quando absorvem nitrato, e segundo, as plantas reutilizam seu nitrogênio com produtos em um grau maior que os animais. Portanto, as vias biossintéticas em plantas, que não fracionam o nitrogênio, dependem de uma variação na composição da fonte de nitrogênio, o que pode revelar plantas com distintas assinaturas isotópicas. Por exemplo, o solo contém mais ^{15}N que a atmosfera, assim, plantas que fixam o nitrogênio atmosférico são empobrecidas quanto a esse elemento, em relação às não-fixadoras para um mesmo local (GANNES; DEL RIO; KOCK, 1998).

Nos consumidores, os isótopos estáveis têm sido empregados em estudos que procuram verificar as taxas de turnover (reposição do tecido celular) para carbono e nitrogênio, por meio de experimentos que usam a substituição da dieta, revelando que ela é determinante para a composição isotópica do animal (FRY, 1991; DUCATTI; CARRIJO; PEZZATO, 2002; SAKANO et al., 2005).

Assim, a composição isotópica dos animais é similar à de sua dieta quanto aos isótopos de carbono e enxofre,

mas é em média 3 a 5‰ mais enriquecida em nitrogênio (PETERSON; FRY, 1987) (Figura 7).

Esse incremento se dá, principalmente, devido à excreção do nitrogênio isotopicamente mais leve na urina. Dessa forma, se a urina de um consumidor é -1 a -4% empobrecida em relação a sua dieta, suas fezes terão valor de aproximadamente $+2\%$ e seu leite e sangue serão $+4\%$ enriquecidos em ^{15}N .

Quando as cadeias alimentares são examinadas, os diferentes processos de C, N e S destacam-se mais claramente. Os valores isotópicos de nitrogênio aumentam de 10 a 15‰ em muitas cadeias alimentares. Esse aumento é devido à presença de 3 a 5 sucessivas transferências tróficas, cada uma aumentando a concentração de ^{15}N de 3 a 5‰ (MINAGAWA; WADA, 1984). Já para o enxofre é verificado que permanece sem alteração isotópica com o aumento do nível trófico, fazendo de suas medidas um bom indicador, se plantas ou bactérias são importantes fontes aos consumidores (PETERSON; FRY, 1987). O carbono também é um bom indicador de possíveis fontes autotróficas na alimentação dos consumidores, com o incremento de apenas 0 a 1‰ por nível trófico (ARAÚJO-LIMA et al., 1986)

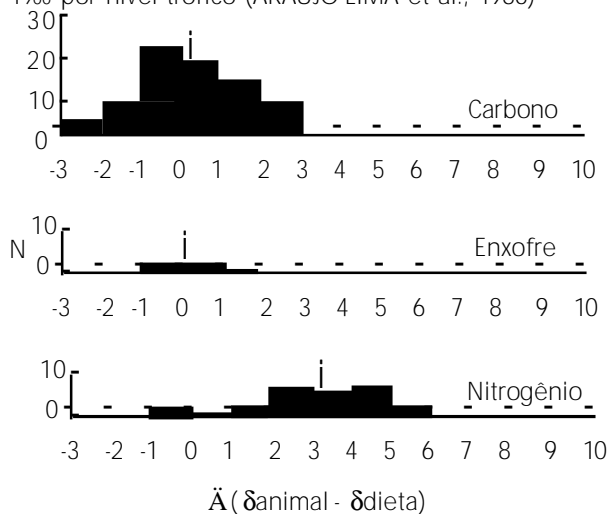


Figura 7- Relações entre a composição isotópica do animal e sua dieta, para isótopos estáveis de carbono, enxofre e nitrogênio. Flechas representam o enriquecimento médio de cada isótopo no tecido dos consumidores (PETERSON; FRY, 1987).

Por isso, um dos isótopos mais utilizados em estudos em teias alimentares aquáticas ou terrestres é o carbono ($\delta^{13}\text{C}$) (CIFUENTES; SHARP; FOGEL, 1988), principalmente, devido às facilidades metodológicas e a sua interpretação. Os resultados desses traçadores podem ser utilizados para testar hipóteses clássicas sobre a estrutura trófica de ambientes conhecidos e/ou testar as várias estruturas

das cadeias alimentares em sistemas, em que análises convencionais são difíceis ou, ainda, não foram realizadas (FRY, 1991)

Em um estudo, sobre a composição isotópica de cadeias alimentares aquáticas, Araújo-Lima et al. (1986) determinaram que a fonte primária de energia para peixes detritívoros (Characiformes) da bacia Amazônica é constituída principalmente por fitoplâncton e não por gramíneas e frutos, como se pensava anteriormente, e que os bagres receberiam carbono proveniente de perifíton ou de uma mistura de plantas não-conhecidas (Figura 8). Contudo, trabalhos dessa natureza são simplesmente qualitativos, já que não determinam a proporção em que as potenciais fontes alimentares contribuem para os organismos; diante desse problema, recentemente, diversos trabalhos propuseram novos métodos na quantificação das potenciais fontes na composição isotópica dos consumidores (mais detalhes ver BEN-DAVID; SCHELL, 2001; PHILLIPS, 2001; PHILLIPS; GREGG, 2001; PHILLIPS; KOCK, 2002; HALL-ASPLAND; HALL; ROGERS, 2005; PHILLIPS; NEWSOME; GREGG, 2005).

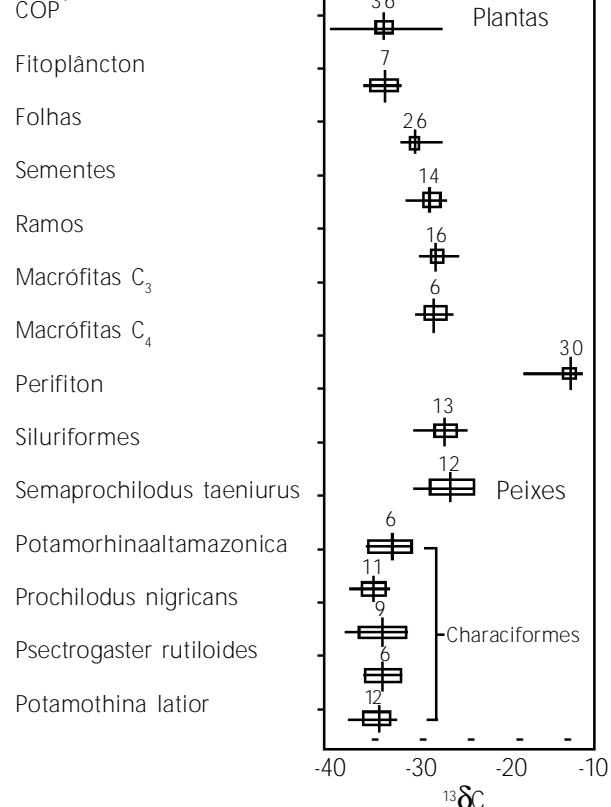


Figura 8- Valores de $\delta^{13}C$ de 8 fontes autotróficas, carbono orgânico particulado (COP), peixes Characiformes e Siluriformes. Linhas verticais indicam médias e as linhas horizontais indicam a dispersão dos dados, os números representam o total de amostras para cada organismo (ARAÚJO-LIMA; et al., 1986).

Nesse mesmo ecossistema, Benedito-Cecilio et al. (2000) verificaram que a contribuição das plantas C₄ para cinco espécies de peixes comercialmente importantes foi significativamente menor durante a estação de águas altas e, que as plantas C₃ (excluindo o fitoplâncton), também contribuíram menos que o esperado. Esses autores reforçaram a importância das espécies detritívoras para a pesca e a dependência, dessas espécies, pelo carbono proveniente das algas (Tabela 3).

Alguns trabalhos têm utilizado isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}C$) combinados com os de nitrogênio ($\delta^{15}N$) em estudos de cadeias alimentares em sistemas rio-planícies de inundação (FRY, 1991; BUNN; DAVIES; WINNING, 2003, MANETTA; BENEDITO-CECILIO; MARTINELLI, 2003) e, também, de reservatórios (BENEDITO-CECILIO; PEREIRA; SAKURAGUI, 2004). Manetta, Benedito-Cecilio e Martinelli (2003) investigaram as fontes de carbono e a posição trófica das principais espécies de peixes na planície de inundação do alto rio Paraná e constataram que os produtores primários de maior contribuição foram as plantas C₃ (Figura 9).

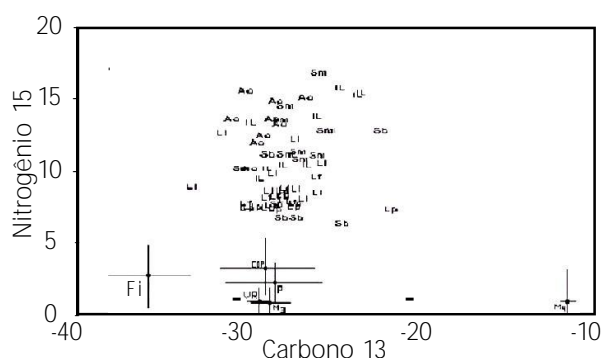


Figura 9- Valor médio e desvio padrão para $\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$ dos produtores primários (Fi=fitoplâncton, VR=vegetação ripária, P=perifíton, M₃=macrófitas aquáticas, C₃, M₄=macrófitas aquáticas, C₄ e COP=carbono orgânico particulado) e das principais espécies de peixes da planície de inundação do alto rio Paraná (MANETTA; BENEDITO-CECILIO; MARTINELLI, 2003).

Tabela 3. Porcentagem sazonal de contribuição de plantas C₄, C₃ e algas fitoplanctônicas para espécies de peixes em trechos do rio Amazonas (a variação representa a contribuição máxima e mínima dos produtores primários) (BENEDITO-CECILIO et al., 2000).

Trecho	Semaprochilodus taenirus			Semaprochilodus insignis			Prochilodus nigricans			Mylossoma duriventre			Colossama macropomum		
	C4	C3	Algas	C4	C3	Algas	C4	C3	Algas	C4	C3	Algas	C4	C3	Algas
águas baixas															
AM2	0-12	0-46	55-88	0-12	0-46	54-88	7-32	0-93	0-68	27	22	51	38	4	58
AM1	0-12	0-46	54-88	0-12	0-46	54-88	0-21	0-80	0-79	27	22	51	38	4	58
SOL1	0-12	0-45	55-88	0-12	0-46	54-88	0-15	0-56	44-85	27	22	52	22	4	74
SOL2	0-12	0-45	55-88	0-12	0-46	54-88	0	0	100	26	22	52	9	4	87
SOL3	0-12	0-46	54-88	0-12	0-46	54-88	0	0	100	26	22	52	9	4	87
águas altas															
AM2	0-13	0-46	55-87	0-13	0-46	54-87	7-33	0-93	0-67	13	46	41	10	38	52
AM1	0-13	0-46	54-87	0-13	0-46	54-87	0-22	0-80	20-78	13	46	41	10	38	52
SOL1	0-12	0-46	55-88	0-12	0-46	54-88	0-15	0-56	44-85	13	46	41	10	38	52
SOL2	0-12	0-46	55-88	0-12	0-46	54-88	0	0	100	13	46	41	10	38	52
SOL3	0-12	0-46	54-88	0-12	0-46	54-88	0	0	100	12	46	42	10	38	52

Em ecossistemas em que o detrito é a principal fonte de matéria orgânica, como mangues e estuários, o uso dos isótopos estáveis de enxofre ($\delta^{34}\text{S}$) é considerado eficaz, como ferramenta para o estudo de fluxo de energia, quando combinado com isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$). Peterson; Howarth e Garritt (1985), objetivando determinar quais as principais fontes de carbono para consumidores detritívoros em um estuário na Nova Inglaterra, coletaram a gramínea *Spartina*, plâncton e plantas C₃ terrestres, além de consumidores, gastrópodos filtradores, em um transecto no oceano em direção à terra firme, passando pelo estuário. Eles verificaram que os consumidores coletados próximos ao oceano eram isotopicamente similares ao plâncton, enquanto que aqueles coletados próximos ao ambiente terrestre eram similares à *Spartina* (Figura 12). Com esses dados foi possível avaliar qual a importância dessas gramíneas para a produção secundária em estuários, os quais se encontram ameaçados devido à intensa pressão que esses ecossistemas costeiros vêm sendo submetidos.

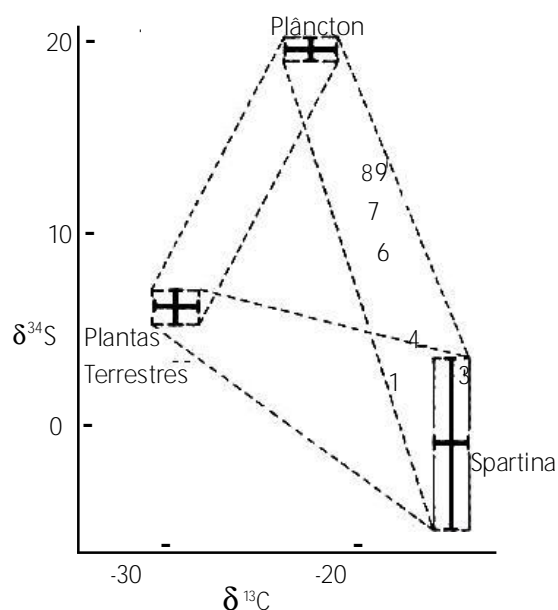


Figura 10- Valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{34}\text{S}$ para plantas terrestres, plâncton e *Spartina alterniflora* em um estuário na Nova Inglaterra. Os números de 1-9 indicam a composição isotópica dos consumidores (gastrópodos filtradores, *Geukensia demissa*) coletados ao longo de um transecto próximo ao ambiente terrestre (1-4) em direção ao oceano (5-9) (PETERSON; HOWARTH; GARRITT, 1985).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isótopos estáveis estão presentes nos ecossistemas e sua distribuição natural reflete uma história integrada aos processos físicos e metabólicos deste. Uma das maiores vantagens no uso dessa técnica está nos estudos de campo, em que as medidas da distribuição isotópica existentes revelam como os componentes do ecossistema estão conectados. Adicionalmente, os processos físicos e biológicos que levam às variações na abundância natural dos isótopos são uma valiosa ferramenta para pesquisadores interessados em medir o fluxo de matéria e energia entre os organismos.

Por outro lado, o uso dessa metodologia não pode ser aplicado como uma "carta branca" para todos os organismos em todos os ecossistemas. Ao contrário, seu uso requer um conhecimento dos efeitos do fracionamento isotópico e das variações naturais quando eles existirem. Ainda assim, mesmo para responder questões mais simples, o uso dos isótopos estáveis é ainda reduzido, especialmente no Brasil.

O desconhecimento dessa técnica por parte da comunidade científica, aliado à falta de instituições e laboratórios que realizem essas análises, dificulta estudos mais aprofundados comparando o funcionamento dos diferentes ecossistemas brasileiros e, também, impede o avanço mais acelerado dessa área. O alto custo que envolve a utilização dessa técnica é uma das principais barreiras para os pesquisadores, principalmente brasileiros. Uma análise isotópica, dependendo do elemento a ser analisado, pode variar de 11 a 130 dólares por uma simples amostra (GEOCHRON LABORATORIES, 2004; RESTON STABLE ISOTOPE LABORATORY, 2004). Entretanto, em um futuro próximo, almeja-se que várias dessas barreiras tenham sido superadas e que o uso dos isótopos estáveis seja mais uma alternativa comum na "caixa de ferramentas" dos ecólogos.

ABSTRACT

Stable isotopes of hydrogen, oxygen, carbon, nitrogen and sulfur, are currently considered an important tool for physiologists, ecologists and other researchers who study cycles of matter and energy in the environment. In the last twenty years this technique has been applied in aquatic environments and has shown in itself very efficient and promising. Stable isotopes of O and H are useful in determining the composition of the water taken by plants. However, C, N and S isotopes are used to

elucidate photosynthetic pathways, physiologic processes in plants or to determine the food sources for consumers in aquatic or terrestrial food webs. Stable isotopes are present in the ecosystems and their natural distributions reflect and integrate the history of to the physical and metabolic processes of the environment. Therefore, this work aims to present in a critical viewing the theoretical basis for the understanding of the mechanisms which involve the use of stable isotopes in ecological studies, with emphasis on freshwater environments.

KEY-WORDS

Stable isotopes. Food web. Aquatic environments.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Nupélia (Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura) e ao PEA (Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) pelo apoio logístico e financiamento; as bibliotecárias Maria Saete Ribellato Arita e Márcia Paiva pela ajuda com o material bibliográfico; ao Jaime Luiz Lopes por editar as figuras; ao Dr. Luiz Carlos Gomes e José Arenas Ibarra pela elaboração do resumo; a Bióloga Cintia Karen Bulla, Dr. Sidinei Magela Thomaz e Dra. Lilliana Rodrigues pela revisão e sugestões ao manuscrito.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. et al. Energy sources for **detritivorous fishes in the Amazon**. Science, Washington, v. 234, n. 4781, p. 1256-1258, 1986.
- BEN-DAVID, M.; SCHELL, D. M. Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a response. Oecologia, Berlin, v. 127, p. 180-184, 2001.
- BENEDITO-CECILIO, E. et al. Carbon sources of Amazonian fisheries. Fisheries Management and Ecology, Oxford, v. 7, p. 305-315, 2000.
- BENEDITO-CECILIO, E.; PEREIRA, A. L.; SAKURAGUI, C. M. Effect of size on the energy acquired in species of the fish from a neotropical reservoir, Brazil. Environmental Biology of Fishes, The Hague, v. 71, p. 313-320, 2004.

- BUNN, S. E.; DAVIES, P. M.; WINNING, M. Sources of organic carbon supporting the food web of an arid zone floodplain river. *Freshwater Biology*, Oxford, v. 48, p. 619-635, 2003.
- CIFUENTES, L. A.; SHARP, J. H.; FOGEL, M. L. Stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry in the Delaware estuary. *Limnology and Oceanography*, Grafton, v. 33, p. 1102-1115, 1988.
- DAWSON, T. E.; BROOKS, P. D. Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. In: Unkovich M. et al. (Ed.). *Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. cap. I, p. 1-18.
- DUCATTI, C.; CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29 - 33, 2002.
- DUCATTI, C. Isótopos estáveis ambientais. São Paulo: Instituto de Biociências: Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, 2004. Apostila.
- FRY, B. Stable isotope of freshwater food webs. *Ecology*, New York, v. 72, n. 6, p. 2293-2297, 1991.
- GANNES, L. Z.; DEL RIO, C. M.; KOCK, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, v. 119a, n. 3, p. 725-737, 1998.
- GEOCHRON LABORATORIES. Disponível em: < <http://www.geochronlabs.com/stable.html>>. Acesso em: 23 nov. 2004.
- HALL-ASPLAND, S. A.; HALL, A. P.; ROGERS, T. L. A new approach to the solution of the linear mixing model for a single isotope: application to the case of an opportunistic predator. *Oecologia*, Berlin, v. 143, p. 143-147, 2005.
- HOBSON, K. A.; WASSENAAR, L. I. Stable isotope ecology: an introduction. *Oecologia*, Berlin, v. 120, p. 312-313, 1999.
- LAJTHA, K.; MICHENER, R.H. (ED.). *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. 316 p.
- LAJTHA, K.; MARSHALL, J. D. Sources of variation in the stable isotopic composition of plants. In: Lajtha, K.; Michener, R. H. (Ed.). *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. cap. I, p. 1-21.
- LOPES, C. A. Variabilidade de isótopos estáveis de carbono e de isótopos estáveis de nitrogênio. 2001. 47 f. Exame Geral de Qualificação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) – Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.
- LOPES, C. A.; BENEDITO-CECILIO, E. Variabilidade isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) em produtores primários de ambientes terrestres e de água doce. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 24, n. 2, p. 303-312, 2002.
- MANETTA, G. I.; BENEDITO-CECILIO, E.; MARTINELLI, L. C. Carbon sources and trophic position of the main species of fishes of Baía, Paraná river floodplain, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 63, n. 2, p. 283-290, 2003.
- MARTINELLI, L. A. et al. Utilização das variações naturais de $\delta^{13}\text{C}$ no estudo de cadeias alimentares em ambientes aquáticos: princípios e perspectivas. *Acta Limnologica Brasiliensia*, Botucatu, v. 1, p. 859-882, 1988.
- MARTINELLI, L. A. et al. ^{15}N natural abundance in plants of the Amazon river floodplain and potential atmospheric N_2 fixation. *Oecologia*, Berlin, v. 90, p. 591-596, 1992.
- MINAGAWA, M.; WADA, E. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Oxon, v. 48, p. 1135-1140, 1984.
- PARK, R.; EPSTEIN, S. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Oxon, v. 21, p. 110-126, 1960.

PETERSON, B. J.; HOWARTH, R. W.; GARRITT, R. H. Multiple stable isotopes used to trace the flow of organic matter in estuarine food webs. *Science*, Washington, v. 227, n. 4962, p. 1361-1363, 1985.

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

PHILLIPS, D. L. Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. *Oecologia*, Berlin, v. 127, n. 166-170, 2001.

PHILLIPS, D. L.; GREGG, J. W. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia*, Berlin, v. 127, n. 171-179, 2001.

PHILLIPS, D. L.; GREGG, J. W. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia*, Berlin, v. 136, n. 261-269, 2003.

PHILLIPS, D. L.; KOCK, P. L. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia*, Berlin, v. 130, p. 114-125, 2002.

PHILLIPS, D. L.; NEWSOME, S. D.; GREGG, J. W. Combining sources in stable isotope mixing models: alternative methods. *Oecologia*, Berlin, v. 144, p. 520-527, 2005.

RESTON STABLE ISOTOPE LABORATORY. Disponível em: <<http://www.isotopes.usgs.gov/prices.htm>> . Acesso em 23 nov. 2004.

RUBENSTEIN, D. R.; HOBSON, K. A. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends in Ecology & Evolution*, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 256-263, 2004.

SAKANO, H. et al. Estimation of nitrogen stable isotope turnover rate of *Oncorhynchus nerka*. *Environmental Biology of Fishes*, The Hague, v. 72, p. 13-18, 2005.

SMITH, B. N.; EPSTEIN, S. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiology*, Rockville, v. 47, p. 380-384, 1971.

UNKOVICH, M. et al. Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. 291 p.

WALKER, G. et al. The use of stable isotopes of water for determining sources of water for plants transpiration. In: UNKOVICH, M. et al. (Ed.). Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems. Dordrecht.: Kluwer Academic Publisher. cap. 4, p. 57-89, 2001.

ZENCICH, S. J. et al. Influence of groundwater depth on the seasonal sources of water accessed by *Banksia* tree species on a shallow, sandy coastal aquifer. *Oecologia*, Berlin, v. 131, p. 8-19, 2002.

Alexandre Leandro Pereira
Laboratório de Ecologia Isotópica – Sala da Pós-Graduação USP /
CENA / ESALQ
Avenida Centenário, 313
Piracicaba - SP
CEP - 13400-970
e-mail: alexmga@yahoo.com.br

TRAMITAÇÃO

Artigo recebido em: 20/03/2006
Aceito para publicação em: 15/02/2007