

Isótopos estáveis de oxigênio e carbono em anéis de crescimento: Uma comparação entre diferentes tempos de reação para obtenção da α -celulose

Stable isotopes of oxygen and carbon in growth rings: A comparison between different reaction times for obtaining α -cellulose.

¹ Ana Cláudia Gama Batista*

² Isabela Maria Souza Silva

³ Maria Gabriella da Silva Araújo

⁴ Luiz Antonio Martinelli

¹ Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP).
E-mail: anaclaudiabatista89@gmail.com

² Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP).
E-mail: isabela_souza@usp.br

³ Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP).
E-mail: gabriella.araujo@usp.br

⁴ Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP).
E-mail: anaclaudiabatista89@gmail.com

Artigo submetido em 02/06/2023, aceito em 07/10/2023 e publicado em 07/10/2023.

Resumo: Os isótopos $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ são indicadores geoclimáticos e ambientais e estão sendo empregados como ferramenta para rastreamento de madeira. Existem inúmeras metodologias para a obtenção da celulose, que é o material utilizado para análise isotópica de material lenhoso. No entanto, os tempos de extração são muito longos, tornando o processo analítico demorado e, em alguns casos, inviáveis. Nosso objetivo é comparar diferentes tempos de extração e verificar se eles interferem no sinal isotópico do carbono e do oxigênio. Foram realizados quatro procedimentos para obtenção da celulose, em diferentes tempos, de 48 e 6 horas, para a remoção dos extrativos. A primeira etapa consiste no processo de remoção dos extrativos na seguinte sequência: (1) álcool/tolueno (1:1), (2) álcool, (3) acetona e (4) água. O processo de deslignificação foi realizado em duas sequências, com (1) clorito e ácido acético glacial por 6 horas e (2) clorito de sódio por 1 hora. As hemiceluloses foram removidas com uma solução de hidróxido de sódio a 17% durante 1 hora, com três repetições. A α -celulose foi obtida em uma solução ácida de ácido acético glacial a 10%, e ao final do tratamento, as amostras foram secas em estufas a 70°C por 2 horas. Para as análises isotópicas, as amostras foram secas e pesadas, sendo submetidas ao espectrômetro de massa para a análise da razão isotópica de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Os resultados sugerem que o tempo de remoção dos extrativos não exercem influência direta na leitura do sinal isotópico do $\delta^{18}\text{O}$ e do $\delta^{13}\text{C}$.

Palavras-chave: Química da madeira; isótopo estável $\delta^{13}\text{C}$; isótopo estável $\delta^{18}\text{O}$; rastreabilidade da madeira.

Abstract: The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ isotopes are geoclimatic and environmental indicators and are used as wood tracking tools. There are numerous methodologies for obtaining cellulose, which is the material used for isotopic analysis of woody material, but the extraction times are often too long, making the

analytical process time-consuming and, in some cases, unfeasible. Our objective is to compare different extraction times and determine if they interfere with the isotopic signal for carbon and oxygen. Four procedures were performed to obtain cellulose at different times, 48 and 6 hours, for extractive removal. The first step involves the removal of extractives in the following sequence: (1) alcohol/toluene (1:1), (2) alcohol, (3) acetone, and (4) water. The delignification process was carried out in two sequences: (1) sodium chlorite and glacial acetic acid for 6 hours and (2) sodium chlorite for 1 hour. Hemicelluloses were removed using a 17% sodium hydroxide solution for 1 hour with three repetitions. α -cellulose was obtained in a 10% glacial acetic acid solution, and at the end of the treatment, the samples were dried at 70°C for 2 hours. For isotopic analyses, the samples were dried, weighed, and subjected to a mass spectrometer for analysis of the isotopic ratio of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. The results suggest a tendency for the extraction time of the wood extractives to interfere with the reading of the $\delta^{18}\text{O}$ isotopic signal, which was not observed for $\delta^{13}\text{C}$.

Keywords: Wood chemistry; stable isotope $\delta^{13}\text{C}$; stable isotope $\delta^{18}\text{O}$; wood traceability.

1 INTRODUÇÃO

Os anéis de crescimento na madeira são importantes indicadores ambientais devido à grande quantidade de informações que podem fornecer. Isso ocorre porque os componentes químicos presentes nos anéis são produtos das reações fisiológicas da planta, que, por sua vez, dependem das condições ambientais e climáticas (Sotoffel e Bollschweiler, 2008; Siegwolf et al., 2022).

A madeira é constituída por compostos como celulose, hemiceluloses, lignina e extrativos, que estão presentes na parede celular (Burger e Richter, 1991; Sjöström, 1993). A utilização desses compostos nos permite desenvolver parâmetros de medição, como densidade, características anatômicas e compreensão dos sistemas ecológicos, climáticos e ciclos biogeoquímicos, como carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio (McCarroll e Loader, 2004; Andreu-Hayles et al., 2019).

Para análises isotópicas de oxigênio e carbono em material vegetal, a celulose é o componente principal, devido à sua estrutura C-H-O e à sua estabilidade química. Atualmente, existem diversos métodos de obtenção de celulose para análise isotópica (Cullen e MacFarlane, 2005; Fines-Neuschild et al., 2015). No entanto, esses métodos geralmente envolvem tempos de extração prolongados, que são importantes para garantir a

obtenção de um material livre de quaisquer compostos ou elementos químicos que possam mascarar o sinal isotópico, mas que, por outro lado, tornam o processo de extração demorado.

Os extrativos da madeira são compostos de natureza diversa, com estruturas de baixa ou alta massa molecular, solúveis em solventes orgânicos ou em água (Silvério et al., 2006; Sarto e Sansigolo, 2010). Na estrutura da madeira, eles desempenham diversas funções, como atribuição de cor, odor, sabor e resistência à degradação. Em uma única amostra de madeira, podem ser encontrados centenas de compostos diferentes (Sjöström, 1993; D'Almeida et al., 2013).

Os métodos de remoção dos extrativos da madeira são diversos (Green, 1963; MacFarlane et al. 1999); no entanto, o processo de remoção dos extrativos é muito demorado e envolve uma sequência de diferentes reagentes em diferentes concentrações. Isso dependerá da metodologia empregada.

Para acelerar o método, várias metodologias estão sendo desenvolvidas ou adaptadas. Para análises isotópicas, é necessário que os componentes químicos da madeira sejam totalmente removidos (Boettger et al., 2007; Chopra e Manikanika, 2022) e que os reagentes do processo não impregnem no material a ser analisado (Leavitt e Danzer, 1993; Loader et al., 1997). Um dos grandes desafios para a implementação de novas metodologias de

redução do tempo de processamento é minimizar a manipulação das amostras físicas e os erros potenciais que poderão interferir na mensuração do $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ (Kagawa et al., 2015; Andreu-Hayles et al., 2019).

O objetivo deste trabalho é apresentar uma nova metodologia que visa reduzir significativamente os tempos de extração dos extrativos da madeira, melhorando a precisão analítica para minimizar erros e, conseqüentemente, acelerar o processo de obtenção da celulose. Além disso, busca-se investigar se o tempo de extração desempenha um papel relevante na medição dos isótopos de oxigênio e carbono ($\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A madeira é um material heterogêneo, composto por celulose, hemiceluloses, lignina, extrativos e água (Fengel e Wegener, 1984; Sivan et al., 2021). Os anéis de crescimento na madeira estão intrinsecamente ligados ao aumento no diâmetro das árvores, resultado da inatividade do câmbio vascular. Conforme a árvore cresce, a composição química da madeira se enriquece com os produtos das reações fisiológicas (Cherubini et al., 2021; Rodriguez et al., 2022). Os anéis de crescimento desempenham um papel fundamental como indicadores da dinâmica florestal, uma vez que são influenciados por vários fatores ambientais e climáticos (Rodriguez-Caton et al., 2021; Büntgen, 2022).

A análise isotópica dos anéis de crescimento permite não apenas compreender os processos fisiológicos nas árvores, mas também investigar as variações climáticas, aspectos ambientais de uma área específica, bem como a origem de espécies florestais (Badea et al., 2021; Paredes-Villanueva et al., 2022; Camarero et al., 2023;). Esses procedimentos são altamente refinados e estão relacionados à composição química do material vegetal (McCarroll e Loader,

2004; Shestakova e Martínez-Sancho, 2021).

A celulose é formada pela glucose, um polímero linear de cadeia longa, que pode cristalizar durante o processo de formação da fibra, ela é principal componente da parede celular vegetal (Heinze, 2016; Almeida et al., 2022). Esta também é um composto muito resistente a degradação. A parede celular primária da celulose conectada a lamela média retem a flexibilidade, sua estrutura porosa que permite a troca intercelular de materiais, o que pode ocasionar o aumento ou o surgimento de uma nova célula (Bock e Norris, 2016; Herzele et al., 2020).

A lignina é um polímero amorfo que atua com uma matriz aglutinante para celulose (Fatehi e Chen, 2016; Younesi-kordkheili e Pizzi, 2020) Ela é formada por unidades de fenilpropano que é responsável pela rigidez da madeira (Sarkanen e Ludwig, 1971; Hatakeyama e Hatakeyama, 2010; Trobot et al., 2019). As hemiceluloses são polímeros parcialmente cristalizados formados por pentoses e hexoses, ligadas as microfibrilas da celulose, formando uma matriz polimérica (Schellere e Ulvskov, 2010; Pauly et al., 2013; Gao et al., 2023).

Os extrativos são os compostos orgânicos responsáveis pela cor, odor e sabor, eles também atuam na resistência ao apodrecimento, fungos e insetos (Roffael, 2016; Siwale et al., 2022). Os compostos extrativos são formados por compostos orgânicos e inorgânicos. As principais classes de extrativos presentes na madeira são os terpenos e seus derivados, triglicérides (graxas e seus derivados) e compostos fenólicos (Telmo e Lousada, 2011; Mora et al., 2022; Santos et al., 2022).

Os compostos fenólicos são encontrados abundantemente na região do alburno e, em algumas espécies, estão presente em quantidades significativas na casca da árvore (D'Almeida et al., 2013; Roffael, 2016, Santos et al., 2022).

A formação dos compostos orgânicos da madeira está relacionada ao processo de fotossíntese (Badea et al., 2021; Mora et al., 2022; Santos et al., 2022). Durante a fotossíntese, ocorre um favorecimento aos átomos de ^{12}C em relação a atmosfera (fracionamento isotópico), modificando os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das plantas em relação a atmosfera (McCarroll e Loader, 2004; Leavitt, 2010; Ren et al., 2023).

A extensão do fracionamento isotópico é principalmente influenciada por fatores climáticos, sendo a precipitação o principal deles. A marcação do $\delta^{13}\text{C}$ nos anéis de crescimento registra o equilíbrio da condutância estomatal e taxa fotossintética, além de estar relacionado com a largura do anel de crescimento e com a densidade da madeira (Loarder et al., 2008; Shestakova e Martínez-Sancho, 2021).

É interessante compreender as respostas das árvores a fatores externos, como o clima e a poluição, bem como a fatores internos, como intempéries e competição. Esses elementos estão relacionados ao desenvolvimento e distribuição das árvores em regiões de diferentes latitudes, onde o crescimento anual é controlado por diversas influências. Essa complexidade dificulta a interpretação dos métodos dendrocronológicos (Shestakova e Martínez-Sancho, 2021; Quesada-Román et al., 2022). Além disso, a composição isotópica do carbono o torna um traçador ambiental utilizado nos estudos dendrocronológicos e na dinâmica florestal (Belmecheri e Lavergne, 2022; Rinne-Garmston et al., 2023).

A composição isotópica do oxigênio, expressa como $\delta^{18}\text{O}$, também desempenha um papel fundamental nesses estudos. Isso ocorre porque a extensão do fracionamento isotópico entre a nuvem e a precipitação depende principalmente da temperatura (McCarroll e Loader, 2004; Rodrigues e Fauth, 2013; Boeschoten et al., 2023). Portanto, o $\delta^{18}\text{O}$ do oxigênio é

uma ferramenta valiosa para analisar e compreender as influências climáticas nas árvores.

A água consumida pelas árvores durante a translocação da seiva mantém o sinal isotópico da água da precipitação inalterado, marcando assim o $\delta^{18}\text{O}$ ao longo dos anéis de crescimento (Badea et al., 2021; Ren et al., 2023). No entanto, à medida que a água se desloca das raízes às folhas através do xilema, ocorre um fracionamento durante esse percurso, e a água presente nas folhas sofre um fracionamento durante a evaporação (McCarroll e Loader, 2004; Gagen et al., 2022).

Além disso, durante o processo de fotossíntese e na formação dos produtos resultantes, ocorre um fracionamento bioquímico (McCarroll e Loader, 2004; Song et al., 2022). Vale ressaltar que o sinal isotópico é fortemente influenciado pela circulação atmosférica (Wassenaar et al., 2013; Reynard et al., 2020).

Os isótopos de carbono e oxigênio são elementos importantes nos anéis de crescimento das árvores, com informações armazenadas em suas estruturas. Por meio desses isótopos, somos capazes de reconstruir climas passados, variações climáticas, aspectos fisiológicos e entender os ciclos biogeoquímicos (Gessler, 2018; Loader et al., 2019). Atualmente, os isótopos estáveis são aplicados em uma ampla gama de estudos, abrangendo animais, alimentos, solos, água, florestas e até mesmo na ciência forense, onde desempenham um papel essencial como ferramentas de referência (Matos e Jackson, 2019; Meier-Augenstein, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Foram utilizadas três espécies florestais comerciais nativas, cedro (*Cedrela spp.*), jatobá (*Hymenaea spp.*) ipê (*Handroanthus spp.*), coletadas na Flona do Tapajós – PA, Manaus – AM e Santarém – PA, respectivamente. Com

ajuda de uma serra circular, os raios representativos das espécies foram cortados no sentido transversal para obtenção das lâminas de madeira com espessura de 1,45 mm (Figura 1). Ambas passaram pelo processo de lixamento para melhor visibilidade do anel de crescimento.

As lâminas foram seccionadas em quatro 4 pontos ao longo do cerne com 1 cm de distância da medula: 0,5 cm; 1,5 cm; 2,5 cm e 3,5 cm.

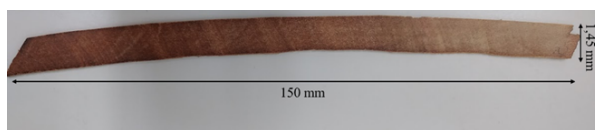


Figura 1. Lâmina de madeira: corte na seção transversal sentido medula – casca

3.2 MÉTODOS

3.2. 1 TRATAMENTO QUÍMICO

Para o tratamento químico seguimos a metodologia descrita por Loader et al. (1997) e Kagawa et al. (2015). O método foi aplicado de duas formas: (I) Sem modificação nos tempos de remoção dos extrativos e deslignificação, denominado de T0 (controle) e (II) com redução no tempo de remoção dos extrativos e deslignificação, denominado T4.

A remoção dos extrativos para o tratamento (I) ocorreu em quatro etapas. Para tal é comum a seguinte sequência de extração: em tolueno-álcool (1:1) por 48 horas a temperatura de 100 °C durante o dia e redução de temperatura para 50 °C durante a noite (1), em álcool por 24 horas a temperatura de 70°C durante o dia e 50° durante a noite (2), em acetona por 24 horas a temperatura de 50°C durante o dia e 30°C durante a noite (3) e em água deionizada por 24 horas a temperatura de 100°C durante o dia e 70°C durante a noite (4).

A remoção dos extrativos para o tratamento (II) também ocorreu em quatro etapas obedecendo as seguintes etapas de

extração: em tolueno-álcool (1:1) por 6 horas a temperatura de 100°C (1), em álcool por 6 horas a temperatura de 100°C (2), em acetona por 6 horas a temperatura de 100°C (3) e em água deionizada por 6 horas a temperatura de 100°C (4).

Em cada etapa são removidas frações diferentes de extrativos presentes nas fibras da parede celular, ao final das etapas de remoção dos extrativos as amostras foram secas em estufa de circulação de ar a temperatura de 60°C ± 5°C. As ligninas foram removidas em dois sistemas de aquecimento, para ambos foram utilizados os mesmos reagentes, mas em diferentes concentrações.

Deslignificação do tratamento (I) foi no sistema de termorregulação (Banho-Maria), por meio de controle de temperatura de fluido térmico, o qual as amostras são colocadas dentro de uma cuba de banho que transfere a calor mediante o ajuste de temperatura. Para esse sistema preparou-se uma solução de 500 ml de clorito de sódio (NaClO₂), ácido acético glacial (CH₃COOH) e água deionizada. As amostras foram colocadas em Becker de vidro e adicionada a solução ao nível que todas as amostras estivessem completamente submersas, e a temperatura foi ajustada a 70°C por 1 hora, a cada uma hora eram trocadas as soluções até que as amostras estivessem totalmente claras.

Deslignificação do tratamento (II) foi no sistema de refluxo contínuo, no qual as amostras ficam submersa em solução na temperatura controlada (GoldFish). Para esse sistema preparou-se uma solução de 175 ml de NaClO₂, CH₃COOH e água deionizada, as amostras foram colocadas nos reboilers e adicionada a solução ao nível que todas as amostras estivessem submersas a temperatura ajustada a 70°C por uma hora. A cada uma hora as soluções eram trocadas até que as amostras estivessem totalmente claras.

Ao final de ambos os processos, todas as amostras foram secas ao ar, na capela de exaustão de gases para

evaporação dos resíduos voláteis da solução por 12 horas.

Para remoção das hemiceluloses os tratamentos (I) e (II) foram submetidos a um único sistema de aquecimento, termorregulação. Para ambos preparou-se uma solução de 1000 ml de hidróxido de sódio (NaOH 17%) a temperatura de 80°C. Os tratamentos foram realizados em três banhos de soda, ao final, as amostras foram lavadas até a redução do pH 10 e secas ao ar, na capela de exaustão de gases para evaporação dos resíduos voláteis da solução por 12 horas.

Para obtenção da α -celulose, as amostras foram neutralizadas em solução ácida (HCl pH2), a temperatura de 25 °C, sob sistema de agitação. Ao final de todo o tratamento químico as mostras foram secas em estufa de ar de circulação forçada a 70°C \pm 5°C por 12 horas, após a secagem as amostras foram preparadas para análise isotópica.

3.2.2 ANÁLISE ISOTÓPICA

Após a secagem, as amostras foram homogeneizadas em moinho misturador (QIAGEN Retsch MM300) e pesadas em balança analítica, em sala climatizada com umidade relativa mantida em 40%. Foram acondicionadas em cápsulas de prata 3,3 x 5,0 mm para análise de razão isotópica de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, os intervalos de massa utilizadas para as amostras de celulose foram 200 a 250 μg . Para análise de carbono, as amostras foram acondicionadas em cápsulas de estanho para análise de razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ com intervalos de massa de 2.7 a 3.0 mg.

As amostras foram submetidas a análise da razão isotópica de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em sistema de espectrometria de massa de fluxo contínuo CF-IRMS utilizando IRMS (Delta V, Thermo Scientific, Germany) acoplado a um analisador de conversão em alta temperatura e fluxo reverso (TC/EA, Thermo Scientific, Germany), por meio de uma interface de gases (ConFlo IV,

Thermo Scientific, Germany). Os valores isotópicos foram obtidos em valor δ definida pela diferença relativa da razão isotópica da amostra pela razão isotópica de um padrão (VSMOW para ^{18}O) (Urey,1931) Equação 1.

Equação1:

$$\delta = (R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}) / R_{\text{padrão}} * 1000$$

Então, por exemplo se $\delta^{18}\text{O} = -10$ ‰, isso significa que a amostra estará empobrecida em relação ao padrão ^{18}O em 1‰.

O padrão de referência utilizado para análise de ^{18}O é VSMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water) foi proposto pela IAEA (International Atomic Energy Agency). O padrão foi preparado a partir da água do oceano destilada, para tal temos: ($^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$) VSMOW= (2005,2 \pm 0,45) $\cdot 10^{-6}$. Atualmente, VSMOW é padrão mais aceito como referência para análise do isótopo de oxigênio.

Para análise do isótopo de carbono o padrão de referência é o PDB (amostra retirada de uma estrutura interna de calcite (CaCO_3) de um fóssil *Belemnitella americana* da Formação Pee Dee do Cretácico na Carolina do Sul), proposto por Craig (1957).

3.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Entendendo que o extrativo da madeira é uma das variáveis que pode influenciar na obtenção da α -celulose e, por consequência, os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ ao longo dos raios das amostras, foram comparados dois grupos T0 (método sem modificação) e T4 (método modificado) a partir da análise da distância de Cohen.

Para comparação estatística entre os grupos, foi utilizado o pacote “DABEST (Data Analysis With Bootstraps - Couple Estimation)” no Software R Studio. O pacote faz uma análise estatística com modelo linear de comparações múltiplas,

onde o tratamento (T4) é comparado com tratamento de referência (T0).

Nessa análise há inúmeras estimativas dos coeficientes do modelo, os quais são gerados pela técnica do Bootstrapping Baesiano (Efron e Tibshirani, 1994). A partir dos coeficientes gerados pelo Bootstrapping são construída uma distribuição de frequências e a partir delas são estimados os intervalos de confiança (IC 95%)

Com os dados obtidos é possível calcular a distância de Cohen, o cálculo se dá pela diferença dos coeficientes gerados pelo modelo estatístico entre os grupos comparados, de acordo com a Equação 2.

$$\text{Equação 2: } d = (Me - Mc) / s$$

Onde: “*d*” é a distância de Cohen; “*Me*” é o coeficiente médio do tratamento gerado pelo modelo; “*Mc*” é o coeficiente médio do controle gerado pelo modelo e o “*s*” é o desvio padrão da população. Para a análise de dados foi utilizado o Software R Studio, lmerTest Package (Kuznetsova et al., 2017).

Para interpretação dos dados devemos considerar o tamanho do efeito, de acordo com Cohen (1992), $d = 0.2$ o tamanho do efeito é considerado pequeno, pouco provável que exista diferença estatística, $d = 0.5$ o tamanho do efeito é considerado médio, contudo, não se pode afirmar se há diferença estatística entre os tratamentos e $d = 0.8$ o tamanho do efeito é considerado alto, nesse caso existe diferença estatística entre as médias. O valor do *d* é expresso no seguinte formato:

$$d [-95\% \text{ IC}; + 95\% \text{ IC}]$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das premissas do trabalho é avaliar se o tempo de remoção dos extrativos da madeira influenciaria na composição isotópica do carbono e do oxigênio. Muito

se questiona quais são as variáveis que podem alterar o sinal isotópico ao longo dos anéis de crescimento.

Os fatores geoclimáticos são frequentemente apontados como os principais elementos que podem influenciar de maneira positiva ou negativa o sinal isotópico. No entanto, é importante observar que, durante o processo de formação das diferentes componentes químicas da madeira, ocorre um fracionamento no sinal isotópico, exceto no caso da celulose, que mantém seu sinal isotópico inalterado durante o processo de formação.

Atualmente, existem diversas metodologias laboratoriais para a extração de celulose, cada uma com diferentes aplicações e concentrações de reagentes. Além disso, o tempo necessário para realizar esses procedimentos também varia consideravelmente.

Na literatura, podemos identificar duas abordagens metodológicas distintas. Uma delas defende a necessidade de uma etapa prévia de remoção dos extrativos presentes na madeira antes do processo de extração de celulose. A outra linha de pensamento acredita que os extrativos não interferem no processo e, portanto, preconiza a extração de celulose sem a etapa de remoção dos extrativos totais.

As análises isotópicas em anéis de crescimento são frequentemente objeto de discussão, dependendo dos objetivos do estudo. No entanto, em métodos amplamente aceitos, chegou-se a um consenso de que a celulose é o material analítico mais recomendado para estudos isotópicos, especialmente quando se trata do isótopo ^{18}O em indivíduos arbóreos.

O carbono, por outro lado, é o isótopo que sofre pouca influência de procedimentos metodológicos. Com base nos conjuntos de

dados analisados, pudemos obter algumas inferências.

A modificação do método de obtenção da celulose ocorreu por meio da alteração da metodologia proposta por Loader et al. (1997) e Kawaga et al. (2015). As modificações foram realizadas no tempo de extração dos extrativos da madeira e no processo de deslignificação das mesmas. Enquanto Kawaga et al., leva aproximadamente 96 horas no processo de remoção dos extrativos, neste trabalho conseguimos reduzir esse tempo para 24 horas, obtendo assim um ganho de 72 horas, sem comprometer as etapas subsequentes.

Na metodologia apresentada por Loader et al. (1997), não há um tempo de reação definido nas etapas dos tratamentos químicos, porém, os reagentes e suas concentrações variam entre as etapas de remoção dos extrativos e deslignificação

na obtenção da celulose, porém, recomenda-se que esse método seja utilizado para amostras de menor tamanho. Autores como Cullen e MacFarlane (2005), Menon et al. (2017) e Lin et al. (2021) enfatizam a importância dos tempos de extração dos extrativos da madeira, considerando-os cruciais para obter celulose livre de contaminantes, o que consequentemente não afetará as análises isotópicas. Segundo a NBR 14660, para o preparo de amostras, um período de extração de seis a sete horas a uma temperatura de $100^{\circ}\text{C} \pm 5$ é suficiente para a remoção ou determinação do teor de extrativos na madeira.

Os resultados apresentados na Tabela 1. São os dados médios obtidos em quatro pontos ao longo do raio das árvores. Foram observadas diferenças nas médias ao longo dos raios, sendo os resultados relevantes para $\delta^{18}\text{O}$. No entanto, as diferenças para o

Espécies	Localidade	Tratamento T0		Tratamento T4	
		$\delta^{18}\text{O}^*$	$\delta^{13}\text{C}^*$	$\delta^{18}\text{O}^*$	$\delta^{13}\text{C}^*$
<i>C. odorata</i>	Flona do Tapajós, PA	+22.39	-25.54	+22.30	-25.72
<i>Handroanthus spp.</i>	Santarém, PA	+25.12	-25.59	+25.67	-25.36
<i>H. courbaril</i>	Manaus, AM	+24.13	-26.92	+27.83	-27.41
da madeira.		$\delta^{13}\text{C}$ não foram evidentes.			

A deslignificação em um sistema de refluxo contínuo também se mostrou eficaz

Tabela 1. Valores $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ para madeiras oriundas de floresta tropical amazônica

*valores médios para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$

Os resultados de $\delta^{18}\text{O}$ variaram aproximadamente 3‰ nos tratamentos T0 e T4, enquanto as variações nas medições de $\delta^{13}\text{C}$ entre os diferentes tratamentos foram inferiores a 1‰ (Tabela 1). É provável que o tempo de extração não exerça uma influência significativa no sinal isotópico do carbono. No entanto, é importante notar que determinar uma variação aceitável para o isótopo de $\delta^{18}\text{O}$ ainda é um desafio, geralmente requerendo

padrões de calibração para uma análise mais precisa (Coplen,2011; Gröning,2018; Coplen,2020).

Para madeiras da região amazônica, é esperado que o ^{13}C seja menos enriquecido, do que os resultados obtidos. No caso do isótopo ^{18}O , espera-se um enriquecimento maior ou igual a +27‰ (Roden et al., 2000; Martinelli et al., 2022), porém, os resultados obtidos mostraram que a maioria das madeiras são

menos enriquecida em ^{18}O , com exceção de *H. courbaril*, que possui um valor de $\delta^{18}\text{O}$ acima de +27‰ no tratamento T4.

Ohasihi et al. (2016), trabalhou com as espécies *Eschweilera coriácea*, *Iryanthera coriácea* e *Protium hebetatum* proveniente da região Amazônica, Manaus- AM, encontrou valores para $\delta^{18}\text{O}$ semelhantes aos obtidos neste trabalho, entorno de +25‰ a 26 ‰, segundo os autores, as variações observadas no $\delta^{18}\text{O}$ e no $\delta^{13}\text{C}$ sugerem um padrão sazonal, que reflete as respostas fisiológicas ao déficit hídrico, outra hipótese está relacionada ao crescimento radial anual de cada espécie.

Na literatura, encontramos várias metodologias para obter celulose em anéis de crescimento. No entanto, os mecanismos utilizados são praticamente os mesmos. O que podemos observar é que as etapas de preparo de amostras e os procedimentos químicos devem ser executados com grande precisão (Loarder et al., 2003; Ferrio e Voltas, 2005; Kagawa et al., 2015; Ohasihi et al., 2016). O tempo de remoção dos extrativos e os equipamentos usados nesse processo são as variáveis que menos influenciam nos isótopos de carbono e oxigênio.

De acordo com Cullen e MacFarlane (2005), as amostras de celulose livres de extrativos tendem a apresentar enriquecimento maior de ^{18}O e ^{13}C em comparação com as amostras de madeira. Notavelmente, apenas a *H.courbaril* do tratamento T4 obteve um valor $\delta^{18}\text{O}$ mais elevado em comparação com as outras amostras do mesmo tratamento. Isso pode estar relacionado à origem das espécies, já que a *C. odorata* e o *Handronathus spp.* estão localizados em áreas muito próximas, o que pode estar vinculado ao fracionamento do $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação dessas regiões.

O tamanho do efeito para $\delta^{18}\text{O}$ foi de 0,69 [IC 95% -0,19; 1,66], o que pode ser considerado um efeito de magnitude média. Portanto, existe a probabilidade de que o tempo de remoção dos extrativos da madeira possa interferir nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ (Figura 2).

No entanto, não podemos afirmar com precisão, uma vez que esse efeito pode estar sendo influenciado mais pelos valores $\delta^{18}\text{O}$ das diferentes regiões do que propriamente pela diferença de tratamento, dado que as espécies florestais estão distribuídas em regiões distintas.

Os extrativos da madeira desempenham diversas funções ao longo dos anéis de crescimento e uma delas é a resistência à degradação, e estão presentes em grandes quantidades no cerne, alguns desses compostos podem ser hidrolisáveis ou não (Gonçalves e Lelis, 2001 e D'Almeida et al., 2013, Siwale et al., 2022). Estudos apontam que quando os extrativos não são removidos completamente da estrutura da fibra podem alterar o sinal isotópico na fibra de celulose (Helle et al., 2022).

Embora a celulose seja uma molécula que não sofre alterações significativas durante o processo de formação e seja pouco reativa a tratamentos químicos, existe a suposição de que a interferência no valor isotópico do oxigênio esteja relacionada à remoção incompleta dos componentes químicos secundários presentes na estrutura da fibra. Essa é uma hipótese a ser considerada. De acordo com Ferrio e Voltas (2005) e Ohasihi et al. (2016), a interferência no sinal isotópico ao longo dos anéis de crescimento pode estar associada aos efeitos ambientais e fisiológicos aos quais as espécies florestais estão sujeitas.

No que diz respeito aos valores de $\delta^{13}\text{C}$, observou-se um tamanho de efeito de -0,17

[IC 95% -0,95; 0,73], indicando um efeito de magnitude pequena. Portanto, não havendo diferença significativa dos extrativos na análise do isótopo de carbono (Figura 3).

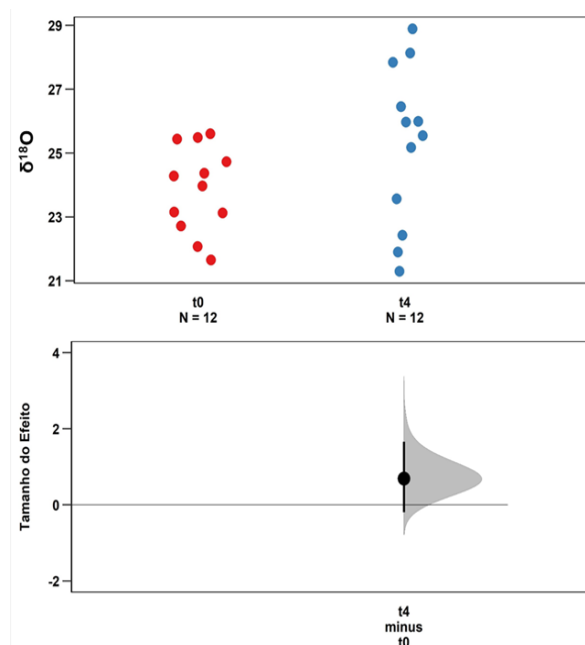


Figura 2. Gráfico de distribuição de pontos do $\delta^{18}\text{O}$ por tratamento T0 e T4 (acima) e diferença de média (a baixo)

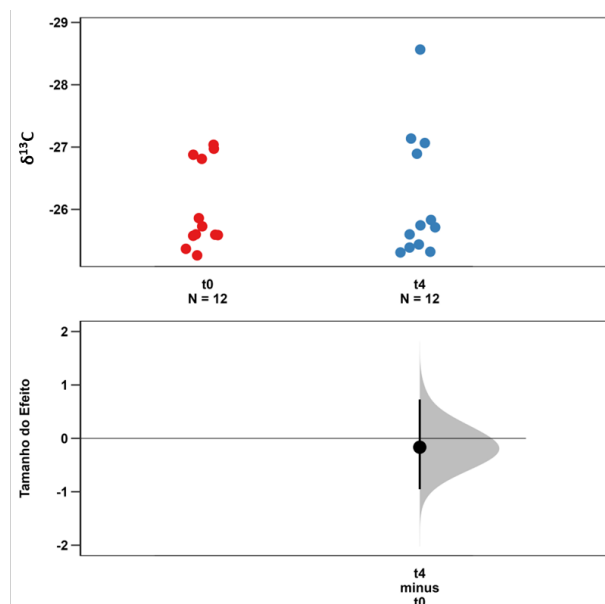


Figura 3. Gráfico de distribuição de pontos do $\delta^{13}\text{C}$ por tratamento T0 e T4 (acima) e diferença de média (a baixo)

O tratamento 4 tem variação de 3‰ nos valores isotópicos do oxigênio em

comparação com o tratamento controle (T0). Conforme definido pela Agência Internacional de Energia Atômica (2018), considera-se que uma variação de 1‰ seja aceitável entre a amostra e o padrão. Leavitt (2010), discute especificamente a questão da variação isotópica em indivíduos arbóreos. A variação isotópica dentro de um mesmo indivíduo é de aproximadamente 0,5‰ a 2‰, o que o autor considera baixo. No entanto, entre diferentes espécies da mesma localidade, essa variação pode chegar a 1‰ a 4‰, tanto para o carbono quanto para o oxigênio para espécies de mesma localidade.

No que diz respeito ao $\delta^{13}\text{C}$, os resultados foram menos negativos do que o esperado para a região amazônica. Nessa região, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ tendem a ser mais baixos devido à intensidade da ciclagem do CO_2 nas áreas de florestas tropicais. É importante destacar que fatores ambientais desempenham um papel significativo na determinação da abundância do isótopo estável de carbono. Um exemplo disso é o processo de abertura e fechamento dos estômatos, que são fatores fisiológicos que regulam o valor do $\delta^{13}\text{C}$ nas plantas (Medina et al., 1999; Martinelli et al., 2022).

Cullen e MacFarlane (2005); Helle et al. (2022), observaram que a remoção dos extrativos geralmente leva a valores de $\delta^{13}\text{C}$ menos negativos. Isso ocorre porque durante a formação dos anéis de crescimento, os extrativos são gradualmente depositados, principalmente quando o tecido da árvore morre, formando o cerne da árvore. Durante esse processo de formação e deposição dos extrativos, pode ocorrer o fracionamento isotópico do carbono, resultando em um material vegetal menos enriquecido em ^{13}C (Leavitt e Szejner, 2022).

Existem muitos métodos analíticos destinados à obtenção da celulose para análise isotópica (Loader et al., 1997; Cullen e MacFarlane, 2005; Brookman e Whittaker, 2015; Kagawa et al., 2015; Schollaen et al. 2017, Rinne-Garmston et al., 2022). Esses métodos foram desenvolvidos devido as quantidades de resina e óleos presente na madeira, os quais podem interferir nas análises, pois estão ligados a lignina e a outros componentes que isotopicamente se diferem ao longo do raio do cerne (Fines-Neuschild et al., 2015, Helle et al., 2022). Para menor interferência analítica é recomendado o isolamento da celulose, pois reduz as variações da biossíntese dos compostos orgânicos presentes na madeira.

Contudo, o processo de obtenção da celulose é metodologicamente demorado e com incertezas sobre a sua precisão, e como resultado final pode-se obter uma fibra de celulose intacta ou degradada, o que implica na imprecisão aos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ (Harlow et al., 2006, Rinne-Garmston et al., 2022). Um tratamento químico rápido e melhor definido é o desejável.

A partir deste estudo, constatamos que o tratamento 4 é mais eficiente na obtenção da celulose em comparação com os métodos descritos por Loader et al. (1997) e Kagawa et al. (2015). Obtivemos uma economia de 72 horas em relação aos outros procedimentos, o que agiliza consideravelmente as análises isotópicas sem comprometer a qualidade dos resultados. Conforme destacado por Rinne et al. (2005), é importante notar que a necessidade de remover os extrativos pode variar dependendo das espécies florestais.

Durante o processo de obtenção da α -celulose, os resíduos dos componentes químicos presentes na estrutura da fibra são progressivamente removidos, de modo

que, ao final do procedimento, a fibra esteja completamente desprovida de extrativos, lignina e hemiceluloses, restando apenas a molécula de celulose. É importante destacar que ao longo de todo processamento não ocorre a troca de ^{18}O com os solventes durante as extrações (Belmecheri et al., 2022; Hugger et al., 2023).

É possível que a formação dos extrativos e os compostos presentes no cerne seja influenciada pelos fatores ambientais durante a transformação do alburno em cerne. Isso sugere uma potencial influência no sinal isotópico (Helle et al., 2022). Ou seja, é provável que o sinal isotópico $\delta^{18}\text{O}$ da amostra de celulose reflita o sinal isotópico dos extrativos presentes no cerne, conforme discutido por Taylor et al. (2008) e Belmecheri et al. (2022).

Nesse contexto, as metodologias de extração da celulose são requisitos essenciais para análises isotópicas em madeira, especialmente para $\delta^{18}\text{O}$, enquanto para o $\delta^{13}\text{C}$ é uma etapa opcional e pode ser realizada para fins de comparação entre amostras. Os extrativos presentes na madeira não parecem exercer uma influência significativa no sinal isotópico ao longo do raio da madeira. No entanto, uma vez que os estudos de isótopos estáveis em madeira no Brasil ainda são recentes, é pertinente realizar pesquisas adicionais para aprofundar essa questão.

5 CONCLUSÕES

Considerando a complexidade dos métodos de obtenção da celulose para análise isotópica, observamos que as diversas abordagens têm pouca influência nos resultados isotópicos. As características registradas nos anéis de crescimento estão intrinsicamente relacionadas a fisiologia, clima e localização. No entanto, para

análise de $\delta^{18}\text{O}$, é altamente recomendável o uso da celulose, pois este carboidrato, que é mais abundante na estrutura vegetal, mantém seu registro isotópico inalterado durante a formação, bem como durante o crescimento em diâmetro e altura das árvores. Quanto ao $\delta^{13}\text{C}$, ele é menos sensível aos processos metodológicos, sendo que a etapa de extração pode ser opcional, dependendo do escopo de estudo.

A redução do tempo de extração dos extrativos é eficaz quando realizada em temperatura elevadas, acelerando a reação e reduzindo a concentração dos extrativos nas fibras, uma vez que os resíduos dos extrativos serão removidos nas etapas subsequentes. Esse procedimento nos permite minimizar potenciais interferências causadas por componentes químicos presentes na estrutura da madeira, proporcionando resultados isotópicos mais precisos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Programa de Cooperação Acadêmica em Segurança Pública e Ciências Forenses (PROCAD – SPCF) concedida a primeira autora.

REFERÊNCIAS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14660: Madeira – Amostragem e preparação para análise.** Rio de Janeiro. 13p. 2004.

ALMEIDA, M. N.F.; VIDAURRE, G. B.; LOUZADA, J. L. P. C.; PEZZOPANE, J. E. M.; OLIVEIRA, J. C. L.; SILVA, M. E. C. M.; BARROS, A. I.R. A; MATOS, C. d. C.; ALVES, A. M.M.; CAMPOE, O. C.; ALVARES, C. A. Differences in wood anatomy and chemistry of a Eucalyptus urophylla clone explained by site climate

conditions. *Canadian Journal of Forest Research*, 52,2022.

ANDREU-HAYLES, L.; LEVESQUE, M.; MARTIN-BENITO, D.; HUANG, W.; HARRIS, R.; OELKERS, R.; LELAMD, C.; MARTIN-FERNÁNDEZ, J.; ANCHUKAITIS, K. J. A high yield cellulose extraction system for small whole wood samples and dual measurement of carbon and oxygen stable isotopes. *Chemical Geology*, 504,53-65,2019.

BADEA, Silviu – Laurentiu; BOTORAN, O. R.; IONETE, R. E. Recent Progresses in Stable Isotope Analysis of Cellulose Extracted from Tree Rings. *Plants*, 10, 2743,2021. <https://doi.org/10.3390/plants10122743>. 2021.

BELMECHERI, S.; LAVERGNE, A. Compiled records of atmospheric CO₂ concentrations and stable carbon isotopes to reconstruct climate and derive plant ecophysiological indices from tree rings. *Dendrochronologi*,63,2020.

BELMECHERI, S.; WRIGHT, W. E.; SZEJNER. Sample Collection and Preparation for Annual and Intra-annual Tree-Ring Isotope Chronologies. Siegwolf et al. Stable Isotopes in Tree Rings, 8, cap. 4, *Tree Physiology*,2022.

BOCK, J. H.; NORRIS, D. O. Chapter 1 - Introduction to Forensic Plant Science. *Forensic Plant Science*, p 1-22,2016.

BOESCHOTEN, L. E.; VLAM, M.; SASS-KLAASSEN, U.; MEYER-SAND, B. R. V.; BOOM, A.; BOUKA, G. U.D.; CILIANE-MADIKOU, J. C.U.; OBIANG, N. L. E.; GUIESHON-ENGONGORO, M.; LOUMETO, J.J.; MBIKA, Dieu-merci M.F.; MOUNDOUNGA, C. G.; NDANGANI, R. M.D.; BOUROBOU, D. N.; SLEEN, P. V.d.; TASSIAMBIA, S. N.; TCHAMBIA, M. T.; TOUMBA-PAKA, B. B.L.; ZANGUIM, H. T.; ZEMTSA, P. T.;

- ZUIDEMA, P.A. Stable isotope ratios in wood show little potential for sub-country origin verification in Central Africa. *Forest Ecology and Management*, 544, 2023.
- Boettger, T.; Haupt, M.; Knoeller, K.; Weise, S.M.; Waterhouse, J.S.; Rinne, K.T.; Loader, N.J.; Sonninen, E.; et al. Wood cellulose preparation methods and mass spectrometric analyses of delta C-13, delta O-18, and nonexchangeable delta H-2 values in cellulose, sugar, and starch: an inter laboratory comparison. *Anal. Chem.*, 79, 4603–4612, 2007.
- BROOKMAN, T.; WHITTAKER, T. Experimental assessment of the purity of α -cellulose produced by variations of the Brendel method: Implications for stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) dendroclimatology. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 2012.
- BÜNTGEN, U. Scrutinizing tree-ring parameters for Holocene climate reconstructions. *WIREs CLIMATE CHANGE*, 2022.
- BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da Madeira**. São Paulo Nobel, 1991. 154p.
- CAMARERO, J. J.; COLANGELO, M.; RODRÍGUEZ – GONZÁLEZ, P. M. Tree growth, wood anatomy and carbon and oxygen isotopes responses to drought in Mediterranean riparian forests. *Forest Ecology and Management*, 529, 2023.
- CHERUBINI, P. BATTIPAGLIA, G.; INNES, J. L. Tree Vitality and Forest Health: Can Tree-Ring Stable Isotopes Be Used as Indicators?. *Current Forestry Reports*, 7, 69-80, 2021.
- CHOPRA, L. M. Extraction of cellulosic fiber from natural resources: A short review. *Material Today: Proceedings*, 48, 1265-1270, 2022.
- COHEN, J. Quantitative methods in psychology: a power primer. *Psychological Bulletin*, v. 112, n. 1, p. 155-159, 1992.
- COPLIN, T. B. Guidelines and recommended terms for expression of stable- isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25, 2538-2560, 2011.
- COPLIN, T. B. United States Geological Survey. **Report of Stable Isotopic Composition**. Reston, Virginia, 1-5, 2020.
- CRAMER, R.D.; JARVIS, I. Chapter 11 - Carbon Isotope Stratigraphy. *Geologic Time Scale*, vol 1, p 309-343, 2020.
- CULLEN, L.E.; MACFARLANE, C. Comparison of cellulose extraction methods for analysis of stable isotope ratios of carbon and oxygen in plant material. *Tree Physiol*, p. 563–569, 2005.
- D’ALMEIDA, M. L. O.; KOGA, M. E. T.; FERREIRA, D. C.; PIGOZZO, R. J. B.; CHERUBIN, M. J. **Composição química da madeira e matérias primas fibrosas**. Celulose: Área Celulose e Papel. São Paulo, SENAI-SP, 2013. p 11-35.
- EFRON, B.; TIBSHIRANI, R.J. **An introduction to the bootstrap**. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- FARQUHAR, G.D.; EHLERINGER, J.R.; HUBICK, K.T. CARBON ISOTOPE DISCRIMINATION AND PHOTOSYNTHESIS. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* p 503-537, 1989.
- FATEHI, P.; CHEN, J. Extraction of Technical Lignins from Pulping Spent Liquors, Challenges and Opportunities. Production of Biofuels and Chemicals from Lignin. *Biofuels and Biorefineries*, 6, 2016. DOI 10.1007/978-981-10-1965-4_2.

- FENGEL, D.; WEGENER, G. WOOD: **Chemistry, Ultrastructure, Reaction.** Walter de Gruyter Berlin – New York, 1984.
- FERRIO, J.P.; VOLTAS, J. Carbon and oxygen isotope ratios in wood constituents of *Pinus halepensis* indicators of precipitation, temperature and vapour pressure deficit. *Tellus*, 57B, 164-173, 2005.
- FINES-NEUSCHILD, S.; BOUCHER, É.; VERNAL, A. de; GÉLINAS, Y.; LECLERC, P. Accelerated solvent extraction—An efficient tool to remove extractives from tree-rings. *Dendrochronologia*, p. 45-48, 2015.
- GAGEN, M.; BATTISPAGLIA, G.; DAUX, V.; DUFFY, J.; DORADO-LIÑÁN, I.; HAYLES, L. A.; MARTÍNEZ-SANCHO, E.; McCARROL, D.; SHESTAKOVA, T. A.; TREYDTE, K. Climate Signals in Stable Isotope Tree-Ring Records. Siegwolf et al. Stable Isotopes in Tree Rings, 8, cap. 19, *Tree Physiology*, 2022.
- GAO, Y.; GUO, M.; WANG, D.; ZHAO, D.; WANG, M. Advances in extraction, purification, structural characteristics and biological activities of hemicellulose: A review. *Internacional Journal of Biological Macromolecules*, 225, 467-783, 2023.
- GESSLER, A. Editor's highlight for TSAF D-17-00396: carbon and oxygen isotopes in tree rings—climate signals and microsite effects. *Trees*, 332, 881-882, 2018.
- GONÇALVES, C. de A.; LELIS, R. C. C. TEORES DE TANINOS DA CASCA E DA MADEIRA DE CINCO LEGUMINOSAS ARBÓREAS. *Ambiente e Floresta*, p. 167. 2001.
- Green, J.W. **Wood cellulose.** In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Ed. R.L. Whistler. Academic Press, New York, pp 9—21, 1963.
- GRÖNING, M. **Stable Isotope Internal Laboratory Water Standards: Preparation, Calibration and Storage.** TEL Technical Note No. 03, 2018.
- HARLOW, A.B.; MARSHALL, J.D.; ROBINSON, A.P. A multi-species comparison of ^{13}C from whole wood, extractive-free wood and holocelulose. *Tree Physiology*, p. 767-774. 2006.
- HATAKEYAMA, H.; HATAKEYAMA, T. Lignin Structure, Properties, and Applications. *Biopolymers*, Volume 232, 2010.
- HEINZE, T. **Cellulose: Structure and Properties. Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials.** vol 271, 2016.
- HELLE, G.; PAULY M.; HEINRICH, I.; SCHOLLÄN, K.; Balanzategui, D.; SCHÜRHECK, L. Stable Isotope Signatures of Wood, its Constituents and Methods of Cellulose Extraction. Siegwolf et al. Stable Isotopes in Tree Rings, 8, cap. 5, *Tree Physiology*, 2022.
- HELLE, G.; PAULY, M.; HEINRICH, I.; SCHOLLÄN, K.; BALAZATEGUI, D.; SCHÜRHECK, L. Stable Isotope Signatures of Wood, its Constituents and Methods of Cellulose Extraction. Siegwolf et al. Stable Isotopes in Tree Rings, 8, cap. 5, *Tree Physiology*, 2022.
- HERZELE, S.; HERWIJNEN, H. W.G. V.; GRIESSER, T.; GINDL-ALTMUTTER, W.; RÖBLER, C.; KONNERTH, J. Differences in adhesion between 1C-PUR and MUR wood adhesives to (ligno)cellulosic surfaces revealed by nanoindentation. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 98, 2020.

- IAEA – International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. TEL Technical Note No.03. Stable Isotope Laboratory water Standards: Preparation, Calibration and Storage. GRÖNING, Manfred. *Technical Procedure Note*. No 43,2018.
- KAGAWA, A.; SANO, M.; NAKATSUKA, T.; IKEDA, T.; KUBO, S. An optimized method for stable isotope analysis of tree rings by extracting cellulose directly from cross-sectional laths. *Chem. Geol.*, p. 16–25. 2015.
- Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB (2017). “lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models.” *Journal of Statistical Software*, *82*(13), 1-26. doi:10.18637/jss.v082.i13<https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>.
- LEAVITT, S. W. Tree-ring C–H–O isotope variability and sampling. *Science of the Total Environment*,408,5244-5253,2010.
- LEAVITT, S. W.; SZEJNER, P. Intra-annual tree-ring isotope variations: do they occur when environment remains constant?. *Tree*, 36,865-868, 2022.
- Leavitt, S.W.; Danzer, S.R. Method for batch processing small wood samples to holocellulose for stable-carbon isotope analysis. *Anal. Chem.* 65,87–89, 1993.
- LIN, Q.; HAUNG, Y.; YU, W. Effects of extraction methods on morphology, structure and properties of bamboo cellulose. *Industrial Crops & Products*, 169,2021.
- LOADER, N. J.; MACCARROL, D.; MILES, D.; YOUNG, G.H.F.; DAVIES, D.; RAMSEY, C. B. Tree ring dating using oxygen isotopes: a master chronology for central England. *Journal of Quaternary Science*,34,475-490,2019.
- LOADER, N.J., SANTILLO, P.M., WOODMAN-RALPH, J.P., ROLFE, J.E., HALL, M.A., GAGEN, M., ROBERTSON, I., WILSON, R., FROYD, C.A., MCCARROLL, D. Multiple stable isotopes from oak trees in southwestern Scotland and the potential for stable isotope dendroclimatology in maritime climatic regions. *Chem. Geol.*, 252, 62–71, 2008.
- LOADER, N.J.; Robertson, I.; Barker, A.C.; Switsur, V.R.; Waterhouse, J.S. An improved technique for the batch processing of small whole wood samples to α -cellulose. *Chem. Geol.*, 136,313–317,1997.
- LOADER, N.J.; ROBERTSON, I.; BARKER, A.C.; SWITSUR, V.R.; WATERHOUSE, J.S. An improved technique for the batch processing of small wholewood samples to -cellulose. *Chem. Geol.*, p. 313–317,1997.
- LOARDER, N.J.; ROBERTSON, I.; MCCARROLL, D. Comparison of stable carbon ratios in the whole wood, cellulose and lignin of oak tree-rings. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 196,395-407,2003.
- MACFARLANE, C.; WARREN, C. R.; WHITE, D.A.; ADAMS, M.A. A rapid and simple methods for processing wood to crude cellulose for analysis of stable carbon isotopes in tree rings. *Tree Physiology*, 19,831-835,1999.
- MARTINELLI, L.A.; REZENDE, C. E.; NARDOTO, G. B.; JARDIM, A. C. Uma breve história da metodologia isotópica. *Isótopos Forenses*.2022.
- MATOS, M. P.V.; JACKSON, G. P. Isotope ratio mass spectrometry in forensic science applications. *Forensic Chemistry*, 13,2019.
- MCCARROLL, D., LOADER, N.J. Stable isotopes in tree rings. *Quat. Res. Rev*,23, 771–801, 2004.

- MEDINA, E.; MARTINELLI, L. A.; BARBOSA, E.; VICTORIA, R. L. Natural abundance of ^{13}C in tropical grasses from INPA, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, *herbarium. Brazilian Journal of Botany*, 22(1), 1999.
- MEIER-AUGENSTEIN, W. From stable isotope ecology to forensic isotope ecology — Isotopes' tales. *Forensic Science International*, 300, 89-98, 2019.
- MENON, M. P.; SELVAKUMAR, R.; KUMAR, P. S.; RAMAKRISHNA. Extraction and modification cellulose nanofiber derived from biomass for environmental application. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 42750-42773, 2017.
- MORA, M.; FÁBREGAS, E.; CÉSPEDES, F.; BARTROLÍ, J.; PUY, N. Production and separation of value-added compounds from pine wood using pyrolysis and biorefinery techniques. *Fuel Processing Technology*, 238, 2022.
- NAGAVCIUC, V.; KERN, Z.; PERȘOIU, A.; KESJÁR, D.; POPA, I. Aerial decay influence on the stable oxygen and carbon isotope ratios in tree ring cellulose. *Dendrochronologia*, 49, 110-117, 2018.
- OHASHI, S.; DURGANTE, F. M.; KAGAWA, A.; KAJIMOTO, T.; TRUMBORE, S. E.; XU, X.; ISHIZUKA, M.; HIGUCHI, N. Seasonal variations in the stable oxygen isotope ratio of wood cellulose reveal annual rings of trees in a Central Amazon terra firme forest. *Oecologia*, 180, 685-696, 2016.
- PAREDES-VILLANUEVA, K.; BOOM, A.; OTTENBURGH, J.; VAN DER SLEEN, P.; MANZANEDO, R. D.; BONGERS, F.; ZUIDEMA, P. A. Isotopic Characterization of Cedrela to Verify Species and Regional Provenance of Bolivian timber. *Tree-Ring Research*, 78(2), 73-89, 2022.
- PAULY, M.; GILLE, S.; LIU, L.; MANSOORI, N.; SOUZA, A. de; SCHULTINK, A.; XIONG, G. Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238, 627-642, 2013.
- PERICOLO, O.; AVANZI, C.; RIPULLONE, F.; NOLA, P. A Novel Simplified Protocol for Pre-Processing Whole Wood Samples for Stable Isotope Analysis in Tree Rings. *Forest*, 14, 631, 2023.
- QI, H.; COPLEN, T. B., JORDAN, J. A. Three whole-wood isotopic reference materials, USGS54, USGS55, and USGS56, for $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$, and $\delta^{15}\text{N}$ measurements. *Chemical Geology*, 442, 47-53, 2016.
- QUESADA-ROMÁN, A.; BALLESTEROS-CÁNOVAS, J. A.; GEORGE, S. St.; STOFFEL, M. Tropical and subtropical dendrochronology: Approaches, applications, and prospects. *Ecological Indicator*, 144, 2022.
- REN, J.; SCHUBERT, B. A.; LUKENS, W. E.; XU, C. The oxygen isotope value of whole wood, α -cellulose, and holocellulose in modern and fossil wood. *Chemical Geology*, 623, 2023.
- REYNARD, L. M.; RYAN, S. E.; GUIRGUIS, M. G.; CONTRERAS-MARTÍNEZ, M.; POMPIANU, E.; RAMIS, D.; DOMMELEN, P. V.; TUROSS, N. Mediterranean precipitation isoscape preserved in bone collagen $\delta^2\text{H}$. *Scientific Reports*, 10, 2020.
- RINNE, K.T; BOETTGER, T; LOADER, N.J, ROBERTSON, I.; SWITSUR, V.R.; WATERHOUSE, J.S. On the purification of α -cellulose from resinous wood for

- stable isotope (H, C and O) analysis. *Chemical Geology*, p. 75-82.2005.
- RINNE-GARMSTON, K. T.; HELLE, G.; LEHMANN, M. M.; SAHLSTEDT, E.; SCHLEUCHER, J.; WATERHOUSE, J. S. Newer Developments in Tree-Ring Stable Isotope Methods. Siegwolf et al. Stable Isotopes in Tree Rings, 8, cap. 7, *Tree Physiology*, 2022.
- RINNE-GARMSTON, K. T.; TANG, Y.; SAHLSTEDT, E.; ADAMCZYK, B.; SAURER, M.; SALMON, Y.; CARRASCO, M. D. R. D.; HÖLTTÄ, T.; LEHMANN, M. M.; MO, L.; YOUNG, G. H.F. Drivers of intra-seasonal $\delta^{13}\text{C}$ signal in tree-rings of *Pinus Sylvestris* as indicated by compound-specific and laser ablation isotope analysis. *Plant, Cell & Environment*, 46, 2649-2666, 2023.
- RODEN, J.; LIN, G.; EHLERINGER, J. R. A mechanistic model for interpretation of hydrogen and oxygen isotope ratios in tree-ring cellulose. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol.64, 21-35, 2000.
- RODRIGUES, G. B.; FAUTH, G. Isótopos estáveis de carbono e oxigênio em ostracodes do Cretáceo: metodologias, aplicações e desafios. *Terra e Didática*, vol 9, 34-49, 2013.
- RODRIGUEZ, D. R. O.; HEVIA, A.; SÁNCHEZ-SALGUERO, R.; SANTINI JR, L.; CARVALHO, H. W. P. de; ROIG, F. A.; TOMAZELLO-FILHO, M. Exploring wood anatomy, density and chemistry profiles to understand the tree-ring formation in Amazonian tree species. *Dendrochronologia*, 71, 2022.
- RODRIGUEZ-CATON, M.; ANDREU-HAYLES, L.; MORALES, M. S.; DAUX, V.; CHRISTINE, D. A.; COOPMAN R. E.; ALVAREZ, C.; RAO, M. P.; ALISTE, D.; FLORES, F.; VILLALBA, R. Different climate sensitivity for radial growth, but uniform for tree-ring stable isotopes along an aridity gradient in *Polylepis tarapacana*, the world's highest elevation tree species. *Tree Physiology*, 41, 1353-1371, 2021.
- ROFFAEL, E. Significance of wood extractives for wood bonding. *Appl Microbiol Biotechnol*, p 1589-1596. 2016.
- SANTOS, M. B.; SILLERO, L.; GATTO, D.A.; LABIDI, J. Bioactive molecules in wood extractives: Methods of extraction and separation, a review. *Industrial Crops & Products*, 186, 2022.
- SARKANEN, K.V.; LUDWIG, C.H. (Eds.) **Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley-Interscience, P.241-266, 1971.
- SARTO, C.; SANSIGOLO, C. A. Cinética da remoção dos extrativos da madeira de *Eucalyptus grandis* durante a polpação kraft. *Acta Scientiarum Technology*, v.32, n.3; 227-235. 2010.
- SCHELLER, H.; ULVSKOV, P. Hemocelluloses. *Rev. Plant Biol.* vol 61, p63-89. 2010.
- SCHOLLAEN, K.; BASCHEK, H.; HEINRICH, I.; SLOTTA, F.; PAULY, M.; HELLE, G. A Guideline for sample preparation in modern tree-ring stable isotope research. *Dendrochronologia*, p. 133-145, 2017.
- SHESTAKOVA, T. A.; MARTÍNEZ-SANCHO, E. Stories hidden in tree rings: A review on the application of stable carbon isotopes to dendro sciences. *Dendrochronologia*, 65, 2021.
- SIEGWOLF, R.T.W.; BROOKS, J. R.; RODEN, J.; SUARER, M. Stable Isotopes in Tree Rings. *Tree Physiology*, vol 8, 2022.
- SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. de A.; GOMIDE, J. Lívio; R., F. P.; PILÓ-

- VELOSO, D. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. *Revista Árvore*, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622006000600016>.
- SIVAN, P.; RAO, K. S.; RAJPUT, K.S. Anatomy and cell wall chemistry of tension wood in *Hibiscus cannabinus*. *Bosque*, 42,99-110,2021.
- SIWALE, W.; FRODESON, Stefan; BERGHEL, Jonas; HENRIKSSON, Gunnar; FINELL, Michael; ARSHADI, Mehrdad; JONSSON, Carina. Influence on off-gassing during storage of Scots pine wood pellets produced from sawdust with different extractive contents. *Biomass and Bioenergy*, 156,2022.
- SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and application**. London: Academic Press, 1993. 293 p.
- SONG, X.; LORREY, A.; BARBOUR, M. M. Environmental, Physiological and Biochemical Processes Determining the Oxygen Isotope Ratio of Tree-Ring Cellulose. Siegwolf et al. Stable Isotopes in Tree Rings, 8, cap. 10, *Tree Physiology*, 2022.
- STOFFEL, M.; BOLLSCHWEILER, M. Tree-ring analysis in natural hazards research—an overview. *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.*; 8, 187-202, 2008.
- TAYLOR, A. M.; BROOKS, J. R.; LACHENBRUCH, B.; MORRELL J. J.; STEVE, V. Correlation of carbon isotope ratios in the cellulose and wood extractives of Douglas-fir. *Dendrochronologia*, p. 125-131. 2008.
- TELMO, C.; LOUSADA, J. The explained variation by lignin and extractive contents on higher heating value of wood. *Biomass and Bioenergy*, p 1663-1667. 2011.
- TEZER, S.; WASSENAAR, L.J. Araguás-Araguás; AGGARWAL, P.K. Global isoscapes for $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ in precipitation: improved prediction using regionalized climatic regression models. *Hydrology and Earth System Sciences*, 17, 1-16, 2013.
- TRIBOT, A.; AMER, G.; ALIO, M. A.; BAYNAST, H. de; DELATTRE, C.; PONS, A.; M., Jean – Denis; CALLOIS, Jean – Marc; VIAL, C.; MICHAUD, P.; DUSSAP, Claude – Gilles. Wood – lignin: Supply, extraction processes and use as bio-based material. *European Polymer Journal*, 112, 2019.
- YOUNESI-KORDKHEILI, H.; PIZZI, A. Improving the properties of urea-lignin-glyoxal resin as a wood adhesive by small addition of epoxy. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 102, 2020.